

**Untersuchungen zur Stabilität von Tierarzneimitteln und
über Wechselwirkungen ausgewählter Wirkstoffe mit einem
Modellbiofilm aus *Escherichia coli* und *Pseudomonas fluorescens*
in Tränkwasserleitungen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

im Fachbereich Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
vorgelegt von

Friederike Hahne
staatl. geprüfte Diplom-Lebensmittelchemikerin

2023

Gutachter

1. Prof. Dr. Gerd Hamscher

Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie

Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Prof. Dr. Melanie Hamann

Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Justus-Liebig-Universität Gießen

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis	12
1 Zusammenfassung	1
2 Abstract	4
3 Einleitung und Zielstellung	7
3.1 Veterinärantibiotika in der Tierhaltung und Umwelt.....	7
3.2 In dieser Arbeit verwendete Antibiotika.....	12
3.2.1 Sulfadiazin und Trimethoprim	12
3.2.2 Tylosin A.....	14
3.3 Biofilme als Lebensform.....	16
3.3.1 Biofilmentwicklung und Zusammensetzung der Biofilmmatrix	16
3.3.2 Quorum Sensing	17
3.3.3 Bakterielle Biofilmbildner und Modellorganismen	18
3.4 Resistenzmechanismen und -entwicklung in der Umwelt.....	20
3.4.1 Einteilung der Antibiotikaresistenzen	21
3.4.2 Spezifische Resistenzmechanismen gegenüber SDZ, TMP und Makroliden	21
3.4.3 Resistenzmechanismen im Biofilm.....	22
3.5 Stand der Biofilmforschung in Wasserleitungen und -aufbereitung.....	23
3.6 Analysetechniken	24
3.6.1 Massenspektrometrie	24
3.6.2 Bildgebende MALDI-Massenspektrometrie (MALDI-MSI)	26
3.7 Zielstellung.....	29
4 Ergebnisse, Diskussion und Ausblick	30
4.1 Stabilitätsuntersuchungen von Sulfadiazin und Trimethoprim in wässrigen Lösungen	30
4.1.1 Methodvalidierung	30
4.1.2 Stabilitätsuntersuchungen	31
4.2 Methodenentwicklung und -validierung von Tylosin A.....	40

4.3	Entwicklung eines Modellbiofilms	44
4.3.1	Vorgehen zur Entwicklung des Modellbiofilms.....	44
4.3.2	Überprüfung und Variationen des Versuchsaufbaus des Modellbiofilms	46
4.3.3	Darstellung des Biofilms durch MS-Imaging mittels MALDI-MS.....	49
4.4	Interaktionen zwischen Modellbiofilm und Veterinärantibiotika	56
4.4.1	Aufbau des Versuchs.....	56
4.4.2	Einfluss des Modellbiofilms auf Veterinärantibiotika	57
4.4.3	Einfluss der Veterinärantibiotika auf den Modellbiofilm.....	62
4.4.4	Darstellungen der Modellbiofilme mittels MS-Imaging nach Antibiotika- konfrontation.....	73
4.4.5	Diskussion der Interaktionen zwischen den Modellbiofilmen und ausgewählten Veterinärantibiotika	80
4.5	Charakterisierung der Transformationsprodukte von Tylosin A	87
4.5.1	Vorgehen zur Identifizierung.....	87
4.5.2	Stabilitätsuntersuchungen des Transformationsproduktes	88
4.5.3	Ergebnisse der MS-Messungen.....	93
4.5.4	Zusammenfassung und Ausblick	105
4.6	Transformation von Sulfadiazin unter Druck und Temperatur.....	106
4.6.1	Hintergrund.....	106
4.6.2	Identifizierung des Transformationsproduktes von SDZ.....	107
4.6.3	Stabilitätsuntersuchungen zu SDZ _{ex}	111
4.6.4	Nachweis antibiotischer Aktivität.....	112
4.6.5	Interaktion zwischen Modellbiofilm und SDZ _{ex}	114
4.6.6	Zusammenfassung und Ausblick	118
4.7	Interaktion von Sulfadiazin mit reduzierenden Zuckern	119
4.7.1	Hintergrund.....	119
4.7.2	Versuchsaufbau und Ergebnisse.....	119
4.7.3	Identifizierung des Produktes mit Lactose.....	123
4.7.4	HPLC-UV-Untersuchung der Arzneimittelformulierung der TU Braunschweig....	126
4.7.5	Zusammenfassung und Ausblick	128
5	Experimenteller Teil	129
5.1	Materialien, Geräte und Chemikalien	129
5.1.1	Allgemein.....	129
5.1.2	Geräte und Materialien der MALDI-MS-Messung.....	131

5.1.3	Chemikalien.....	132
5.2	Datenauswertung und Statistik.....	134
5.3	HPLC-Methoden und -Validierung.....	135
5.3.1	Formeln zur Berechnung der NWG und BG nach DIN 32645.....	135
5.3.2	SDZ und TMP.....	136
5.3.3	TYL A.....	137
5.4	Stabilitätsuntersuchungen von SDZ und TMP.....	141
5.4.1	Vorgehen zur Stabilitätsuntersuchung in verschiedenen wässrigen Lösungen....	141
5.4.2	Vorgehen zur Stabilitätsuntersuchung in Eisen-Lösungen.....	142
5.5	Methoden zur Herstellung und Untersuchung des Modellbiofilms.....	142
5.5.1	Vorgehen zu den Untersuchungen an einem Modellbiofilm.....	142
5.5.2	Berechnung von LR und PK.....	145
5.5.3	Vorbereitung und Durchführung der MALDI-MS-Versuche.....	145
5.5.4	Isolierung von TYL-TP und Bestimmung der exakten Masse.....	146
5.5.5	Kryokultivierung.....	147
5.6	Methoden zum SO ₂ -extrudierten SDZ und dessen TP.....	147
5.6.1	Isolierung des TP in autoklavierter AB-Lösung in MM.....	147
5.6.2	Ansetzen der Lösungen für Stabilitätsuntersuchungen.....	147
5.6.3	HPLC-UV-Methode.....	147
5.6.4	Durchführung des BRT-MRL-Suchtests.....	148
5.6.5	SDZ _{ex} -Konfrontation mit dem Modellbiofilm.....	148
5.7	Methoden für den Nachweis von Interaktionen von SDZ und TMP mit reduzierenden Zuckern.....	149
5.7.1	HPLC-UV-Methode.....	149
5.7.2	Ansetzen der Lösungen und Versuchsdurchführung.....	149
5.7.3	Isolierung des Adduktes und Bestimmung der exakten Masse.....	150
5.7.4	Untersuchung der Arzneimittelformulierung.....	150
6	Literaturverzeichnis.....	151
7	Anhang.....	174
7.1	Ergebnisse aus den Modellbiofilmuntersuchungen und den Antibiotikakonfrontationsversuchen.....	174
7.1.1	Zellgehalte der Einzelbiofilmversuche.....	174
7.1.2	Bestimmung der Wiederfindung von SDZ und TMP in steriler Matrix.....	175

7.2	MALDI-MS-Ergebnisse	176
7.2.1	Erste Testdurchführungen	176
7.2.2	Phospholipide – Vorschläge zu Summenformeln	177
7.3	HR-MS-Messungen von TP von TYL A	179
7.4	Interaktionseinzelergbnisse von SDZ und Lactose oder Glucose	181
	Veröffentlichungen	183
	Danksagung	184
	Selbstständigkeitserklärung	186

Abkürzungsverzeichnis

AB	Antibiotika
AHL	Acyllhomoserinlaktone
BG	Bestimmungsgrenze
BRT	Brillantschwarz-Reduktionstest
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
c-di-GMP	zyklisches Di-Guanosinmonophosphat
CE	Kollisionsenergie (collision energy)
CIP	Ciprofloxacin
DBÄ	Doppelbindungsäquivalent
DBU	Deutsche Bundesstiftung Umwelt
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIN	Deutsches Institut für Normung
DMT	Demycinosyltylosin
ECOFF-Wert	epidemiologischer Cut-Off-Wert
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
ESI	Elektrospray-Ionisation (electrospray ionization)
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility
Glc	Glucose
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (high performance liquid chromatography)
K _B E	koloniebildende Einheit
K _{ow}	<i>n</i> -Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
Lac	Lactose
LR	logarithmische Reduzierung (log reduction)
<i>m/z</i>	Verhältnis von Masse zu Ladung
MALDI	Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation (matrix-assisted laser desorption/ionization)
MBBR	moving bed biofilm reactor
MHK	minimale Hemmkonzentration
MM	Minimalmedium

MS	Massenspektrometer
MSI	bildgebende Massenspektrometrie (mass spectrometry imaging)
NL	Normalisierungsniveau (normalization level)
NWG	Nachweisgrenze
OD ₆₀₀	Optische Dichte gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm
OMT	5-O-Mycaminosyltylonolid
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
PK	prozentualer Anteil der abgestorbenen Zellen (percentage killed)
PVC	Polyvinylchlorid
Q	Quadrupol
QS	Quorum Sensing
QTOF	Quadrupol mit nachgeschaltetem Flugzeitmassenspektrometer
QTRAP	Triple-Quadrupol mit linearer Ionenfalle
RP	Umkehrphase (reversed-phase)
RSD	relative Standardabweichung
SDZ	Sulfadiazin
SDZ _{ex}	SO ₂ -extrudiertes Sulfadiazin (1-N-(pyrimidin-2-yl)benzen-1,4-diamin)
SMALDI	Raster-Mikrosonden-MALDI-Technik (scanning microprobe MALDI)
TIC	Gesamtionen-Chromatogramm (total ion chromatogram)
TMP	Trimethoprim
TOF	Flugzeitanalysator (time-of-flight)
TP	Transformationsprodukt(e)
TYL	Tylosin
UV	Ultraviolett
WDF	Wiederfindung
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)
XIC	extrahiertes Ionen-Chromatogramm (extracted ion chromatogram)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1: Summe der Antibiotikaabgabemenge (bezogen auf die jeweilige Grundsubstanz) in Deutschland in den Jahren 2011 bis 2022; prozentuale Angabe gibt die Reduktion im Vergleich zum Jahr 2011 an (BVL, 2023).	8
Abbildung 3.2: Antibiotikaabgabemengen von Tetracyklinen, Penicillinen, Sulfonamiden, Makroliden und Folsäureantagonisten im Zeitraum von 2011 bis 2022 (BVL, 2023).	9
Abbildung 3.3: Struktur von Sulfanilamid, Sulfadiazin (SDZ) und Trimethoprim (TMP).	12
Abbildung 3.4: Mechanismus der bakteriellen Folsäuresynthese mit Kennzeichnung der Angriffspunkte von Sulfonamiden und TMP, (Drews, 1980; Tačić et al., 2017).	13
Abbildung 3.5: Struktur von Tylosin A mit $R_1 = \text{CHO}$ und $R_2 = \text{CH}_3$ mit den Zuckern Mycinosose (links), Mycaminosose (2. Zucker von rechts) und Mycarose (rechts), nach Paesen <i>et al.</i> (1995).	15
Abbildung 3.6: Biofilmentwicklung: Stufe 1: initiales Anheften von planktonischen Zellen an der Oberfläche, Stufe 2: Produktion von EPS und dadurch irreversible Anheftung an der Oberfläche, Stufe 3: frühe Entwicklung der Biofilmarchitektur, Stufe 4: Reifung der Biofilmarchitektur, Stufe 5: Ablösen von planktonischen Zellen aus dem Biofilm; nach Stoodley <i>et al.</i> , (2002), bearbeitet und entnommen aus Van Houdt & Michiels (2005).	17
Abbildung 3.7: A) schematische Darstellung des TOF mit Reflektron und darunter der zugehörige Spannungsverlauf (entnommen aus Radionova <i>et al.</i> , 2016); B) Darstellung des TOF des TripleTOF® 5600+ von AB Sciex (entnommen aus AB Sciex™, 2020).	26
Abbildung 3.8: Darstellung der MALDI-Technik: a) Probenhalter mit Matrixkristallisationslösung und Probe; b1) Vergrößerung von a) Laserpuls trifft Matrix mit Probe, b2) Matrix wird durch Laserpuls ionisiert und verdampft. Analyt aus der Probe erhält Ladung; b3) Dampf expandiert und es entsteht eine Wolke (bearbeitet aus Harris, 2014).	27
Abbildung 3.9: Schema des MSI-Prozesses: A) Die mit Matrix besprühte Probe wird mit dem Laserstrahl an den einzelnen Rasterpunkten beschossen; B) Von jedem Punkt wird ein Massenspektrum aufgenommen; C) Massenspektren werden anhand der Software den Rasterpunkten bzw. der Position auf der Probe zugeordnet. Die Intensität der Signale bestimmter m/z -Verhältnisse wird farbkodiert; in Anlehnung an (Römpp & Spengler, 2013).	28
Abbildung 4.1: UV-Chromatogrammausschnitte von SDZ und TMP in verschiedenen Lösungen unter Lichteinfluss nach 15 Monaten.	35
Abbildung 4.2: A) Darstellung des HPLC-UV-Gradienten für TYL A und Derivate, Anteile umgerechnet in Einzeleluenten; B) Darstellung des pseudobinären Gradienten mit Mischeluenten.	41
Abbildung 4.3: UV-Chromatogramm des Tylosin-Standards mit einer Konzentration von 100 µg/mL TYL A, detektiert bei 280 nm. A: TYL A; B: TYL B, C: TYL C, D: TYL D; DMT: Demycinosyltylosin; y-Achse unterbrochen.	42
Abbildung 4.4: Mikroskopaufnahme des Modellbiofilms auf dem PVC-Coupon; Größenverhältnisse abgeschätzt: ca. 650 x 300 µm ²	50
Abbildung 4.6: Massenspektren von PVC-Coupons mit A) Biofilm (gekennzeichnet sind typische m/z -Verhältnisse von Phospholipiden) und B) ohne Biofilm mit m/z -Verhältnis des DHB-Matrix-Standards von 721,08.	51
Abbildung 4.7: A) Mikroskopaufnahme eines Biofilmausschnitts (500 x 500 µm ²) mit zugehörigen MALDI-MS-Bildern (aufgenommener Massenbereich: m/z -Verhältnisse von 250 – 1000): B) Phospholipid- m/z -	

Verhältnis von 726,5043 (grün); C) Phospholipid- <i>m/z</i> -Verhältnis von 712,4887 (rot); D) <i>m/z</i> -Verhältnis von 365,1053 entspricht einer Dihexose als [M+Na] ⁺ (blau).....	52
Abbildung 4.8: MALDI-MSI des Modellbiofilms ohne Antibiotikakonfrontation (Aufnahmebereich 500 x 500 µm ² , aufgenommener Massenbereich der <i>m/z</i> -Verhältnisse von 200 – 800); A) MSI des <i>m/z</i> -Verhältnisses von 712,4887 (rot); B) Überlagerung der Ionenbilder aus A und C; C) MSI des <i>m/z</i> -Verhältnisses von 726,5043 (grün).....	54
Abbildung 4.9: MALDI-MSI des Modellbiofilms ohne Antibiotikakonfrontation (Aufnahmebereich 500 x 500 µm ² , aufgenommener Massenbereich der <i>m/z</i> -Verhältnisse von 200 – 800); A) MSI des <i>m/z</i> -Verhältnisses von 365,1054 (Dihexose, blau); B) Überlagerung der Ionenbilder von A und des <i>m/z</i> -Verhältnisses von 712,4887 (Phospholipid, rot); C) Überlagerung der Ionenbilder von A und des <i>m/z</i> -Verhältnisses von 726,5043 (Phospholipid, grün).....	54
Abbildung 4.10: Rohrbezeichnungen der Biofilmversuche	56
Abbildung 4.11: A) SDZ- und B) TMP-Gehalte im Versuchszeitraum von Tag 0 bis Tag 7 im Modellbiofilm mit <i>P. fluorescens</i> und <i>E. coli</i> ; Startkonzentrationen: SDZ 150 mg/L; TMP 30 mg/L; alle Werte prozentual bezogen auf den Wirkstoffgehalt der abiotischen Kontrolle am Tag 0 (T0); an den Versuchstagen T0, T4 und T5 von SDZ sind die Standardabweichungen so gering, dass sie nicht sichtbar sind.	57
Abbildung 4.12: A) SDZ- und B) TMP-Gehalte im Versuchszeitraum von Tag 0 bis Tag 5 im Modellbiofilm mit <i>P. aeruginosa</i> und <i>E. coli</i> ; alle Werte prozentual bezogen auf den Wirkstoffgehalt der abiotischen Kontrolle am Tag 0 (T0); (Hahne <i>et al.</i> , 2022).....	58
Abbildung 4.13: UV-Chromatogramme: A) Versuchstag 0 und 7 aus dem Biofilmrohr mit TYL-A-Konfrontation, DMT: Demycinosyltylosin; B) Teilausschnitt des linken Chromatogrammausschnittes mit Kennzeichnung des Transformationsproduktes (TP).....	60
Abbildung 4.14: A) TYL-A-Gehalte über den Versuchszeitraum von 7 Tagen; alle Werte prozentual bezogen auf den Wirkstoffgehalt der abiotischen Kontrolle am Tag 0 (T0); B) relativer Transformationsproduktgehalt (TP) bezogen auf den Tagesstandard von TYL A (100 µg/mL), Versuchstag 4 wurde nur in einem Versuch mit doppelter Probenentnahme durchgeführt. Bei Punkten ohne erkennbaren Fehlerbalken fällt die Standardabweichung so klein aus, dass sie hinter dem Datenpunkt verschwindet; * ANOVA $p < 0,005$	61
Abbildung 4.15: TYL-A-Ergebnisse des Modellbiofilms mit <i>P. aeruginosa</i> , alle Werte prozentual bezogen auf den Wirkstoffgehalt der abiotischen Kontrolle am Tag 0 (T0); abiotische Kontrolle wurde dabei nur einmal ausgeführt; * ANOVA $p < 0,005$ (Hahne <i>et al.</i> , 2022).	62
Abbildung 4.16: Zellgehaltszusammensetzung von <i>E. coli</i> und <i>P. fluorescens</i> vor der Konfrontation (Tag 0) und nach 7-tägiger Konfrontation mit den Antibiotika SDZ und TMP sowie der biotischen Kontrolle ohne Antibiotika; ANOVA: <i>E. coli</i> : $p = 0,17$; <i>P. fluorescens</i> : $p = 0,91$	63
Abbildung 4.17: Zellgehaltszusammensetzung von <i>E. coli</i> und <i>P. aeruginosa</i> vor der Konfrontation (Tag 0) und nach 5-tägiger Konfrontation mit Antibiotika sowie der biotischen Kontrolle ohne Antibiotika (Hahne <i>et al.</i> , 2022); ANOVA: <i>E. coli</i> : $p = 0,20$; <i>P. aeruginosa</i> : $p = 0,55$	65
Abbildung 4.18: Zellgehalte der planktonischen Zellen von <i>E. coli</i> und <i>P. fluorescens</i> in den Biofilmrohren mit SDZ und TMP und ohne Antibiotika (AB) am Versuchstag 1 (T1) und 7 (T7); * ANOVA $p < 0,05$	66
Abbildung 4.19: Zellgehaltszusammensetzung von <i>E. coli</i> und <i>P. fluorescens</i> vor der Konfrontation (Tag 0) und nach 7-tägiger Konfrontation mit TYL A sowie der biotischen Kontrolle ohne Antibiotika; * ANOVA: <i>E. coli</i> : $p < 0,05$, <i>P. fluorescens</i> : $p = 0,19$	67

Abbildung 4.20: Zellgehaltszusammensetzung von <i>E. coli</i> und <i>P. aeruginosa</i> vor der Konfrontation (Tag 0) und nach 5-tägiger Konfrontation mit TYL A sowie der biotischen Kontrolle; der Versuchsansatz ohne AB wurde nur einmal durchgeführt (Hahne <i>et al.</i> , 2022); * <i>t</i> -Test für <i>P. aeruginosa</i> von „mit TYL A“ zu „T0“ $p < 0,005$	68
Abbildung 4.21: Planktonische Zellgehalte von <i>E. coli</i> in den Biofilmrohren mit TYL A und ohne AB zu den Versuchstagen 1, 2, 3, 5, 6 und 7. Versuchstag 5 wurde nur in einem Versuch mit doppeltem Ausstrich durchgeführt; * ANOVA $p < 0,05$	70
Abbildung 4.22: Planktonische Zellgehalte von <i>P. fluorescens</i> in den Biofilmrohren mit TYL A und ohne AB an den Versuchstagen 1, 2, 3, 6 und 7; * ANOVA $p < 0,05$	71
Abbildung 4.22: Mikroskopaufnahme eines mit Biofilm bewachsenen PVC-Coupon, Größenverhältnisse abgeschätzt: ca. $800 \times 500 \mu\text{m}^2$	74
Abbildung 4.24: MALDI-MSI des Modellbiofilms mit SDZ und TMP (Aufnahmebereich $750 \times 750 \mu\text{m}^2$, aufgenommener Massenbereich der m/z -Verhältnisse von 200 – 800); A) MSI des m/z -Verhältnisses von 251,0990 für $[\text{M}+\text{H}]^+$ von SDZ (rot); B) Überlagerung der Ionenbilder von A und C; C) MSI des m/z -Verhältnisses von 291,1452 für $[\text{M}+\text{H}]^+$ von TMP (grün).....	74
Abbildung 4.25: MALDI-MSI von Phospholipiden des Modellbiofilms mit SDZ und TMP (Aufnahmebereich $750 \times 750 \mu\text{m}^2$, aufgenommener Massenbereich der m/z -Verhältnisse von 200 – 800); A) MSI des m/z -Verhältnisses von 712,4887 (rot); B) Überlagerung der Ionenbilder von A und C; C) MSI des m/z -Verhältnisses von 726,5043 (grün).....	75
Abbildung 4.26: MALDI-MSI von TMP mit Phospholipiden des Modellbiofilms (Aufnahmebereich $750 \times 750 \mu\text{m}^2$, aufgenommener Massenbereich der m/z -Verhältnisse von 200 – 800); A) MSI von TMP (rot); B) MSI von TMP (A) und dem Phospholipid mit m/z -Verhältnis von 712,4887 (grün); C) MSI von TMP (A) und Phospholipid mit m/z -Verhältnis von 726,5043 (grün).....	75
Abbildung 4.27: MALDI-MSI von Dihexose und TMP des Modellbiofilms (Aufnahmebereich $750 \times 750 \mu\text{m}^2$, aufgenommener Massenbereich der m/z -Verhältnisse von 200 – 800); A) MSI von TMP (rot); B) Überlagerung der Ionenbilder A und C; C) MSI des m/z -Verhältnisses von 365,1054 (blau, mit $[\text{M}+\text{Na}]^+$ einer Dihexose zugeordnet).....	76
Abbildung 4.28: A) optisches Bild des MALDI-MSI-Ausschnitts (Aufnahmebereich $500 \times 500 \mu\text{m}^2$); B) MSI des m/z -Verhältnisses von 916,5259 für $[\text{M}+\text{H}]^+$ von TYL A (rot), C) MSI von TYL B mit H-Addukt (grün, m/z -Verhältnis von 772,4476); aufgenommener Massenbereich der m/z -Verhältnisse von 250 – 1000).....	77
Abbildung 4.29: MALDI-MSI von Phospholipiden des Modellbiofilms mit TYL A (Aufnahmebereich $500 \times 500 \mu\text{m}^2$, aufgenommener Massenbereich der m/z -Verhältnisse von 250 – 1000); A) MSI des Phospholipids mit m/z -Verhältnis von 712,4887 (grün); B) Überlagerung der Ionenbilder von A und C; C) MSI von TYL A (rot) mit m/z -Verhältnis von 916,5259; D) MSI des Phospholipids mit dem m/z -Verhältnis von 726,5043 (grün); E) Überlagerung der Ionenbilder von C und D.....	78
Abbildung 4.30: MALDI-MSI von TYL A und der Dihexose des Modellbiofilms (Aufnahmebereich $500 \times 500 \mu\text{m}^2$, aufgenommener Massenbereich der m/z -Verhältnisse von 250 – 1000); A) MSI des m/z -Verhältnisses von 365,1054 (blau, mit $[\text{M}+\text{Na}]^+$ einer Dihexose zugeordnet); B) Überlagerung der Ionenbilder von A und C; C) MSI von TYL A (rot).....	79
Abbildung 4.31: UV-Chromatogrammausschnitt von TP1 und TP2 von TYL A im Biofilmrohr im Versuchszeitraum von 7 Tagen, mittels neuer adaptierter HPLC-UV-Methode.....	88
Abbildung 4.32: Stabilität von TYL A (A) und TYL B (B) sowie von zwei Transformationsprodukten von TYL A (TP 1 und TP 2) in Wasser und verschiedenen sauren Lösungen zu den Messzeitpunkten 0, 4 und 15 Stunden sowie nach 6 Tagen (144 h); Ergebnisse beziehen sich auf die Fläche von TYL A zum ersten	68

Messpunkt in der Wasserprobe; y-Achsen sind verschieden skaliert und die x-Achse wird unterbrochen für eine bessere Darstellungsweise.	90
Abbildung 4.33: A) TIC-Ausschnitt einer isolierten Probe von TP1 mittels LC-QTRAP; ab 17,5 min erfolgte keine Datenaufnahme wegen der hohen Intensität von TYL A; B) Massenspektrum des Peaks bei 10,18 min (in A grau markiert).....	91
Abbildung 4.34: Stabilität von TYL A (A) und TYL B (B) sowie von zwei Transformationsprodukten (TP 1 und TP 2) von TYL A in Wasser, Methanol, Natriumhydroxid- und Phosphatpufferlösung zu den Messzeitpunkten 0, 4 und 15 Stunden sowie nach 6 Tagen (144 h); Ergebnisse beziehen sich auf die Fläche von TYL A zum ersten Messpunkt in der Wasserprobe; y-Achsen sind verschieden skaliert und die x-Achse wird unterbrochen für die bessere Darstellungsweise.	92
Abbildung 4.35: Full Scan der isolierten Fraktion des TP1 von TYL A mittels ESI ⁺ -TOF-MS; A) Aufnahme der <i>m/z</i> -Verhältnisse von 100 bis 1000 und B) Ausschnitt der <i>m/z</i> -Verhältnisse von 507 – 510, Isotopenmuster des Hauptsignals von A (<i>m/z</i> -Verhältnis von 508,2658).....	94
Abbildung 4.36: LC-MS-Analyse der TP-angereicherten Probe mittels LC-QTRAP; A) Chromatogrammausschnitt; ab 17,5 min erfolgte keine Datenaufnahme wegen der hohen Intensität von TYL A; B) XIC von A mit <i>m/z</i> -Verhältnis von 998,2 (<i>m/z</i> -Verhältnis von TP1, Kapitel 4.5.3.1).....	96
Abbildung 4.37: Fragmentierungsspektren von TP1 bis TP4 von TYL A (<i>m/z</i> -Verhältnis von 998,5, CE 50 V) mittels LC-MS/MS.....	98
Abbildung 4.38: Möglicher Reaktionsweg zum Neutralverlust von H ₂ SO ₃ bei der Fragmentierung von TP1, das durch eine reduktive Sulfonierung von TYL A entstehen könnte. R1 und R2 sind Reste des Laktorings und R3 des Disaccharids (s. Abbildung 3.5).	104
Abbildung 4.39: UV-Chromatogrammausschnitt von SDZ und TMP in MM vor und nach Autoklavieren mit Detektion eines neuen Peaks bei 3,3 min, dem Transformationsprodukt (TP).	106
Abbildung 4.40: HR-MS-Messung mittels ESI ⁺ -TOF-MS der isolierten Fraktion des potenziellen Transformationsprodukts von SDZ mit A) Full Scan Modus und B) Fragmentierungsspektrum des <i>m/z</i> -Verhältnisses von 187,1 (CE 30 V).....	107
Abbildung 4.41: Fragmentierungsspektrum des <i>m/z</i> -Verhältnisses von 251,1 (SDZ) mittels LC-MS/MS (CE 30 V).	108
Abbildung 4.42: Vorgeschlagerener Reaktionsmechanismus von SDZ zu SDZ _{ex} (1- <i>N</i> -(pyrimidin-2-yl)benzen-1,4-diamin), nach Periša <i>et al.</i> (2013).	109
Abbildung 4.43: Vergleiche des Transformationsprodukts von SDZ (1) mit 1- <i>N</i> -(pyrimidin-2-yl)benzen-1,4-diamin (kommerzieller Standard, 2) mit den A) Retentionszeiten im HPLC-UV-Chromatogramm, B) dem Absorptionsmaximum im UV-Spektrum sowie C) den Fragmentierungsmustern der <i>m/z</i> -Verhältnisse von 187,1 (CE 30 V) mittels LC-MS.....	110
Abbildung 4.44: Brillant-Reduktionstest von SDZ und SDZ _{ex} in verschiedenen Konzentrationszusätzen sowie Negativkontrolle (unbelastete Milch), Positivkontrolle (Penicillin G, PenG, 4 µg/mL).....	112
Abbildung 4.45: Hemmstoffwirkung, bestimmt durch BRT-MRL-Suchtest von SDZ und SDZ _{ex} in verschiedenen Konzentrationen.....	113
Abbildung 4.46: Prozentuale SDZ _{ex} -Gehalte (bezogen auf Tag 0) in den Rohren mit und ohne Biofilm im Versuchszeitraum von 7 Tagen; die Kennzeichnung * bedeutet, dass die Probenahme an diesem Tag nur in einem Versuch durchgeführt wurde.	114

Abbildung 4.47: HPLC-UV-Chromatogramme des Biofilmexperiments mit SDZ _{ex} mit (A) dotierte Biofilmrohrprobe an Tag 0 und 7 und (B) zeitlicher Verlauf der Peakintensität des Transformationsprodukts von SDZ _{ex} von Tag 0 bis Tag 7.....	115
Abbildung 4.48: HR-MS-Messung mittels ESI ⁺ -TOF-MS der isolierten Fraktion des potenziellen Transformationsprodukts von SDZ _{ex} mit A) Full Scan und B) Fragmentierungsspektrum des <i>m/z</i> -Verhältnisses von 229,1 (CE 30 V).....	116
Abbildung 4.49: Acetyliertes SDZ _{ex} nach beschriebener Acetylierung von Sulfonamiden (Sittig <i>et al.</i> , 2014).	117
Abbildung 4.50: Struktur von Sulfanilamid und 4-Aminobiphenyl.	118
Abbildung 4.51: UV-Chromatogramme: A) SDZ und TMP mit Lactose oder Glucose bei einem pH-Wert von 10 nach 3 Monaten; B) Chromatogrammausschnitt von A.....	121
Abbildung 4.52: Anteil der neu gebildeten Peaks in Lösungen von SDZ bzw. SDZ+TMP mit A) Lactose-Zusatz und B) Glucose-Zusatz bei verschiedenen pH-Werten über einen Zeitraum von 16 Wochen; der Anteil der Peakflächen wurde in Relation zu einem SDZ-Standard (100 mg/L) berechnet.....	122
Abbildung 4.53: HR-MS-Messung mittels ESI ⁺ -TOF-MS der isolierten Fraktion des potenziellen Produkts von SDZ und Lactose mit A) Full Scan Modus und B) Fragmentierungsspektrum des <i>m/z</i> -Verhältnisses von 575,1 (CE 20 V).	124
Abbildung 4.54: Strukturvorschlag für Lactosyl-SDZ mit Fragmentierungsbruchstellen und dem zugehörigen <i>m/z</i> -Verhältnis [M+H] ⁺	125
Abbildung 4.55: A) HPLC-UV-Chromatogramme einer Lösung der an TU Braunschweig hergestellten Nanopartikel und der Lösung mit SDZ (S), TMP (T) mit Lactose (Lac) bei pH7, die das Lactosylprodukt von SDZ enthält; B) Chromatogrammausschnitt von A zur Retentionszeit des Lactosylproduktes.....	127
Abbildung 5.1: Übersicht zum Biofilmversuchsablauf.....	143
Abbildung 7.1: Massenspektren des Ionisierungstests mit DHB von SDZ (<i>m/z</i> -Verhältnis von 251,05882) auf einem PVC-Coupon.....	176
Abbildung 7.2: Massenspektren des Ionisierungstests mit DHB von TMP (<i>m/z</i> -Verhältnis von 291,14501) auf einem PVC-Coupon.....	176
Abbildung 7.3: Massenspektren des Ionisierungstests mit DHB von TYL A (<i>m/z</i> -Verhältnis von 916,52616) auf einem PVC-Coupon.....	177
Abbildung 7.4: Fragmentierungsspektren nach ESI ⁺ -TOF-MS-Messungen im positiven Modus von TYL A (CE 40 V) und TP 1-4 (CE 30 V).	179
Abbildung 7.5: HR-MS-Messung von TYL A im negativen Modus; Oben: Full Scan, Unten: Fragmentierungsspektrum des <i>m/z</i> -Verhältnisses von 960 (CE 48,8 V).....	180
Abbildung 7.6: HR-MS-Messung von TP1 im negativen Modus; Oben: Full Scan, Unten: Fragmentierungsspektrum des <i>m/z</i> -Verhältnisses 996 (CE 49,9 V).....	180
Abbildung 7.7: HR-MS-Messung von TP2 im negativen Modus; Oben: Full Scan, Unten: Fragmentierungsspektrum des <i>m/z</i> -Verhältnisses 996 (CE 49,9 V).....	180
Abbildung 7.8: HR-MS-Messung von TP3 im negativen Modus; Oben: Full Scan, Unten: Fragmentierungsspektrum des <i>m/z</i> -Verhältnisses von 996 (CE 49,9 V).....	181

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Antibiotikagehalte in der aquatischen Umwelt und Abwasser in Europa, bearbeitet entnommen aus (Carvalho & Santos, 2016).....	11
Tabelle 3.2: Strukturbeziehungen zwischen den Tylosin-Metaboliten, nach Paesen <i>et al.</i> (1995).	15
Tabelle 4.1: Validierungsparameter von SDZ und TMP.....	30
Tabelle 4.2: Interday-Präzision von SDZ und TMP.....	30
Tabelle 4.3: Lösungen zur Untersuchung der Stabilität von SDZ und TMP.....	31
Tabelle 4.4: SDZ-Konzentrationen in verschiedenen wässrigen Lösungen unter und ohne Lichteinfluss über einen Untersuchungszeitraum von 15 Monaten.....	32
Tabelle 4.5: TMP-Konzentrationen in verschiedenen wässrigen Lösungen unter und ohne Lichteinfluss über einen Untersuchungszeitraum von 15 Monaten.....	33
Tabelle 4.6: SDZ-Konzentrationen in Lösungen mit verschiedenen Eisen-Gehalten unter Lichteinfluss bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank über einen Versuchszeitraum von 50 Tagen.....	36
Tabelle 4.7: TMP-Konzentrationen in Lösungen mit verschiedenen Eisen-Gehalten unter Lichteinfluss bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank über einen Versuchszeitraum von 50 Tagen.....	37
Tabelle 4.8: Validierungsparameter von Tylosin A.....	42
Tabelle 4.9: Übersicht zur Beschreibung der beiden verwendeten Biofilme.....	44
Tabelle 4.10: Vergleich der Zellgehalte von Pseudomonaden und <i>E. coli</i> in Biofilmen aus dieser Arbeit (<i>P. fluorescens</i> und <i>E. coli</i>) und dem Biofilm mit Verwendung von <i>P. aeruginosa</i> (Hahne <i>et al.</i> , 2022).	45
Tabelle 4.11: Zellgehalte der Bakteriensuspension im PVC-Rohr bei einem OD ₆₀₀ -Wert von 0,063.....	47
Tabelle 4.12: Zellgehalte im Biofilm nach geringerer Einstellung des OD ₆₀₀ -Wertes und Verwendung eines höher konzentrierten Minimalmediums im Vergleich zum ursprünglichen Modellbiofilm.....	49
Tabelle 4.13: SDZ-Ergebnisse bei der Konfrontation des Biofilms und der abiotischen Kontrolle ohne Biofilm (MM).....	58
Tabelle 4.14: TMP-Ergebnisse bei der Konfrontation des Biofilms und der abiotischen Kontrolle ohne Biofilm (MM).....	59
Tabelle 4.15: Logarithmische Reduzierung (LR) und prozentualer Anteil der abgestorbenen Zellen (PK) für den Modellbiofilm nach Konfrontation mit SDZ und TMP nach Hamilton (2010).....	64
Tabelle 4.16: Logarithmische Reduzierung (LR) und prozentualer Anteil der abgestorbenen Zellen (PK) für den Biofilm mit <i>P. aeruginosa</i> nach Konfrontation mit SDZ und TMP, nach (Hamilton, 2010).	65
Tabelle 4.17: Logarithmische Reduzierung (LR) und prozentualer Anteil der abgestorbenen Zellen (PK) für den <i>P. fluorescens</i> -Modellbiofilm nach Konfrontation mit TYL A, nach (Hamilton, 2010).	68
Tabelle 4.18: Logarithmische Reduzierung (LR) und prozentualer Anteil der abgestorbenen Zellen (PK) für den Biofilm mit <i>P. aeruginosa</i> nach Konfrontation mit TYL A, nach (Hamilton, 2010).	69
Tabelle 4.19: Resistenzermittlung von Biofilm- <i>E. coli</i> -Isolaten (n = 20) nach AB-Konfrontation (SDZ/TMP und TYL A) mittels MHK ₅₀ und MHK ₉₀ , aufgeführt sind getestete Antibiotika und die untersuchten Konzentrationsbereiche sowie die Referenzkonzentrationen ECOFF (Hahne <i>et al.</i> , 2022).	72
Tabelle 4.20: Lösungen zur Untersuchung der Stabilität von TP von TYL A.....	89

Tabelle 4.21: Ergebnisse zur Stabilität von TYL A und B sowie TP1 und 2 in Acetonitril.	93
Tabelle 4.22: Von PeakView2.2 vorgeschlagene weitere Adduktionen zu m/z -Verhältnis von 508,2658 für TP1 von TYL A sowie deren Anteil am Spektrum.	95
Tabelle 4.23: Übersicht der MS-Ergebnisse von verschiedenen TP von TYL A.	97
Tabelle 4.24: Übersicht über die Fragmente der TP von TYL A mit möglichen Fragmentierungswegen.	99
Tabelle 4.25: Per ESI ⁺ -TOF-MS ermitteltes m/z -Verhältnis und die durch PeakView vorgeschlagenen Summenformeln für TP1 von TYL A sowie exakte Massen, Abweichungen und Doppelbindungsäquivalenten (DBÄ).	100
Tabelle 4.26: Per ESI ⁺ -TOF-MS ermittelte m/z -Verhältnis von 996,4839 und die durch ChemCalc* vorgeschlagenen Summenformeln für TP1 von TYL A sowie exakte Massen und Abweichungen (Durchführung der Messung durch das Institut für Organische Chemie, Dr. Raffael Wende)	100
Tabelle 4.27: Isotopenmuster von TP1 mittels ESI ⁺ -TOF-MS des m/z -Verhältnisses von 508,2658 im Vergleich zu den berechneten Isotopenmustern der zwei Transformationsvorschläge.	102
Tabelle 4.28: Gemessenes und berechnetes Isotopenmuster von TYL A an ESI ⁺ -TOF-MS.	103
Tabelle 4.29: Vorschlag einer Summenformel für TP von SDZ sowie der Fragmente mit theoretisch und experimentell ermitteltem m/z -Verhältnis sowie die berechneten Abweichungen.	108
Tabelle 4.30: Prozentualer Gehalt von SDZ _{ex} in verschiedenen Lösungen bei unterschiedlichen pH-Werten oder in Methanol nach 3 Wochen, Startkonzentration $c = 100 \mu\text{g/mL}$	111
Tabelle 4.31: Vorschlag der Summenformel für das TP von SDZ _{ex} sowie der Fragmente mit theoretisch und experimentell ermitteltem m/z -Verhältnis sowie die berechneten Abweichungen.	117
Tabelle 4.32: Zusammensetzung der Proben des Interaktionsversuchs von SDZ und/oder TMP mit reduzierenden Zuckern und die entsprechenden Kontrollen.	120
Tabelle 4.33: Relativer Produkt-Gehalt bezogen auf den SDZ-Tagesstandard (100 mg/L) in der Einzelwirkstoff- und der Kombinationswirkstofflösung bei pH-Werten von 2, 7 und 10 am Versuchstag (4 Monate) mit Lac oder Glc.	123
Tabelle 4.34: Vorschläge für Summenformeln des Interaktionsversuchs von SDZ und Lactose der m/z -Verhältnisse im Full Scan Modus mit den theoretisch und experimentell ermittelten m/z -Verhältnissen sowie die errechneten Abweichungen.	125
Tabelle 5.1: Geräte und Verbrauchsmaterialien.	129
Tabelle 5.2: Chemikalien.	132
Tabelle 5.3: Herstellung und Zusammensetzung der Minimalmedien.	133
Tabelle 5.4: Herstellung und Zusammensetzung des PBS-Tween-Puffers für 1 L.	134
Tabelle 5.5: Programm zum Autoklavieren.	134
Tabelle 5.6: Messbedingungen für die HPLC-UV-Analyse von SDZ und TMP.	136
Tabelle 5.7: Gradient der HPLC-UV-Analyse für SDZ und TMP.	137
Tabelle 5.8: Messbedingungen für die HPLC-UV-Analyse von TYL A.	137
Tabelle 5.9: Gradient der HPLC-UV-Analyse für TYL A.	138
Tabelle 5.10: Messbedingungen für die HPLC-UV-Analyse von TYL A und TP2.	138
Tabelle 5.11: Angepasster Gradient der HPLC-UV-Analyse für TYL A und TP2.	139

Tabelle 5.12: Messbedingungen für die HPLC-UV-Analyse von TYL A und TP2.	139
Tabelle 5.13: Gradient der HPLC-UV-Analyse zur Isolierung von TYL-TP.....	140
Tabelle 5.14: Messbedingungen für die LC-MS-Analyse von TYL.....	140
Tabelle 5.15: Gradient der LC-MS-Analyse für TYL A.....	141
Tabelle 5.16: MS-Parameter für die LC-MS-Messung von TYL.....	141
Tabelle 5.17: Verwendete Bakterienstämme für die Biofilmversuche mit DSM- und ATCC-Nummern.....	142
Tabelle 5.18: MS-Parametereinstellungen für die MALDI-MS-Messungen.....	146
Tabelle 5.19: MS-Parameter für die Messung am ESI ⁺ -TOF-MS zur Bestimmung der exakten Masse von TYL-TP.....	146
Tabelle 5.20: Gradient der HPLC-UV-Analyse von SDZ _{ex}	148
Tabelle 5.21: Gradient der HPLC-UV-Analyse zum Nachweis einer Interaktion von SDZ und TMP mit reduzierenden Zuckern.....	149
Tabelle 5.22: Substanzkonzentrationen in den angesetzten Zentrifugenröhrchen.....	150
Tabelle 7.1: Einzelergebnisse für Zellgehalte von <i>E. coli</i> für die Konfrontation mit SDZ und TMP.	174
Tabelle 7.2: Einzelergebnisse für Zellgehalte von <i>P. fluorescens</i> für die Konfrontation mit SDZ und TMP.....	174
Tabelle 7.3: Einzelergebnisse für Zellgehalte von <i>E. coli</i> für die Konfrontation mit TYL A.	174
Tabelle 7.4: Einzelergebnisse für Zellgehalte von <i>P. fluorescens</i> für die Konfrontation mit TYL A.....	175
Tabelle 7.5: Wiederfindungsrate von SDZ und TMP in Matrix im Vergleich zu reinem MM.	175
Tabelle 7.6: Lipidvorschläge zu den ermittelten <i>m/z</i> -Verhältnissen aus Metaspace.....	177
Tabelle 7.7: <i>m/z</i> -Verhältnisse von MALDI-MS-Messungen von Biofilmrohr ohne Antibiotika (X3) und Biofilmrohr mit SDZ und TMP (X2ST), die angegebenen Adduktionen, Coverage und die maximale Intensität des jeweiligen <i>m/z</i> -Verhältnisses; Messung durchgeführt mit Dr. Dhaka Bandhari.....	178
Tabelle 7.8: Glucose-Addukt-Gehalt in der Einzelwirkstoff- und der Kombinationswirkstofflösung bei pH-Werten von 2, 7 und 10 an den Versuchstagen von 0 bis 112 Tagen (4 Monate).	181
Tabelle 7.9: Lactose-Addukt-Gehalt in der Einzelwirkstoff- und der Kombinationswirkstofflösung bei pH-Werten von 2, 7 und 10 an den Versuchstagen von 0 bis 112 Tagen (4 Monate).	182

1 Zusammenfassung

Arzneimittel können in der Tierhaltung neben einer Futtermittelmedikation auch über die Tränkwasserleitungen verabreicht werden. In Trink- oder Tränkwasserleitungen können sich Biofilme entwickeln, denen eine hohe Toleranz gegenüber äußeren Einflüssen wie Antibiotika nachgesagt wird. Die Persistenz vieler Wirkstoffe – auch in Spurenkonzentrationen – können Antibiotika-Resistenzen bei Bakterien induzieren. Diese Resistenzentwicklung kann wiederum die in der Humanmedizin angewandten Antibiotika und deren Wirkung auf den Menschen beeinflussen. Daher sollte der Antibiotikaeinsatz auf ein therapeutisch notwendiges Minimum reduziert werden. Um die Mechanismen der Resistenzentwicklung zu verstehen, müssen Eintragswege und mögliche Transformationen der Wirkstoffe aufgeklärt werden. Nur so können Antibiotika in Zukunft gezielt eingesetzt werden und eine Risikoabschätzung kann hinsichtlich des Resistenzentwicklungspotentials erfolgen. Im Kontext dieser Aspekte war das Ziel dieser Arbeit zunächst diverse Stabilitätsuntersuchungen von Sulfadiazin (SDZ) und Trimethoprim (TMP) durchzuführen, einen Modellbiofilm reproduzierbar herzustellen und mögliche Interaktionen zwischen dem Biofilm und den Antibiotika SDZ, TMP und Tylosin A (TYLA) aufzuklären.

SDZ und TMP konnten über einen Zeitraum von 15 Monaten in verschiedenen wässrigen Lösungen beinahe unverändert nachgewiesen werden. Die lange Haltbarkeit ist ein wichtiges Indiz für die hohe Stabilität und Verweildauer der Wirkstoffe in der Umwelt. Der Einfluss einer Eisenlösung auf die Wirkstoffstabilität zeigte, dass die SDZ- bzw. TMP-Konzentrationen unter Lichteinfluss bei 10 mg/L um 10 % bzw. 12 % abnahmen. Eine Abnahme der Wirkstoffkonzentration in Wasser mit hoher Eisenkonzentration kann relevant bei der Arzneimittelverabreichung in Brunnenwasser sein, wie es in der Landwirtschaft teilweise durchgeführt wird.

In dieser Arbeit konnte erfolgreich ein Modellbiofilm aus dem Biofilmbildner *Pseudomonas (P.) fluorescens* und Antibiotika-sensiblen *Escherichia (E.) coli* in einem PVC-Rohr reproduzierbar hergestellt werden. Die Ergebnisse wurden mit dem vom Projektpartner im Projektverbund der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU) parallel entwickelten Modellbiofilm aus *P. aeruginosa* und *E. coli* verglichen. Nach der Konfrontation der Modellbiofilme mit SDZ und TMP wurden keine Veränderungen in der Biofilmdichte und -zusammensetzung festgestellt. Dagegen konnte eine Änderung der Biofilmmorphologie durch Zellclusterbildung mittels Lichtmikroskopaufnahme gezeigt werden. Für die Wirkstoffe SDZ und TMP wurden durch HPLC-UV-Analysen nachgewiesen, dass schon in der ersten Probenahme eine geringere Konzentration in dem Biofilmrohr als in der abiotischen Kontrollprobe vorlag. Für den Modellbiofilm mit *P. aeruginosa* war der SDZ-Unterschied zwischen 2 und 7 % und im Modellbiofilm mit *P. fluorescens* ca. 1 %. Für TMP wurde bei beiden Modellbiofilmen ein Konzentrationsunterschied von 2 % bestimmt. Dies könnte auf eine schnelle Sorption an oder Diffusion in den Biofilm hindeuten, beides bekannte Toleranzmechanismen von Biofilmen.

Bei der Konfrontation der Modellbiofilme mit dem Makrolid TYL A konnten für alle Stämme eine unerwartete Reduktion der Zellgehalte im Biofilm bestimmt werden. Zusätzlich wurde auch hier eine Zellclusterbildung auf einem PVC-Träger nachgewiesen. Im Versuch mit dem *P. aeruginosa*-Modellbiofilm konnte TYL A im Biofilmrohr mit 3 % geringerer Konzentration bestimmt werden, sodass dies, wie bei SDZ und TMP, auf eine Sorption an oder Diffusion in den Biofilm hindeutete. Im Modellbiofilm mit *P. fluorescens* konnte kein Unterschied in den Ausgangskonzentrationen zwischen Biofilm und Kontrollprobe bestimmt werden. Stattdessen konnte ein neuer, stetig wachsender Peak im UV-Chromatogramm der Biofilmprobe detektiert werden. Da der TYL-A-Peak im gleichen Zeitraum stetig abnahm, wurde ein Transformationsprodukt (TP) von TYL A vermutet. In Untersuchungen mit einer längeren Konfrontationsdauer wurden drei weitere TP mit dem gleichen Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z -Verhältnis) nachgewiesen. Durch die Instabilität der TP konnten die Produkte nicht über HPLC-Verfahren für eine NMR-Messung isoliert werden. Deshalb konnte nur auf die exakte Masse aus HR-MS-Messungen und Fragmentierungsmuster als Strukturhinweise zurückgegriffen werden. Die Summenformel mit der geringsten Abweichung von der theoretischen Masse ergab einen Einbau von H_2SO_3 (m/z -Verhältnis von 82) in TYL A, das für eine reduktive Sulfonierung von TYL A stehen könnte. Diese Art von Transformation ist jedoch bisher für Bakterien nicht beschrieben. Die in der Literatur bekannte Phosphorylierung von TYL A konnte durch ^{31}P -NMR ausgeschlossen werden.

Mittels MS-Imaging konnte die räumliche Verteilung des Modellbiofilms mit *P. fluorescens* auf einem PVC-Träger anhand von zwei m/z -Verhältnissen, die den Phospholipiden zugeordnet wurden, dargestellt werden. Die Phospholipidverteilung stimmte in Lichtmikroskopaufnahmen mit der Verteilung der Bakterien gut überein. In den hier durchgeführten Versuchen wurde erstmals ein Biofilm in Kontakt mit Antibiotika unter den Bedingungen in einem Tränkwasserrohr untersucht. SDZ und TMP konnten auf dem Biofilm-Coupon gleichmäßig an den Stellen mit Phospholipiden abgebildet werden. An den Flächen mit einer hohen Bakteriendichte waren SDZ und TMP nicht zu sehen. Somit könnten sie in den Biofilm eingedrungen sein und wären mittels MALDI in der oberen Schicht nicht detektierbar. Dagegen konnte TYL A nur an den Stellen mit einer hohen Bakteriendichte nachgewiesen werden, was im Vergleich dazu eher für eine Sorption an den Biofilm sprechen könnte.

Nach der Konfrontation der hier verwendeten Wirkstoffe konnte für den Antibiotika-sensiblen *E. coli* in beiden Modellbiofilmen mittels der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration keine Resistenzentwicklung nachgewiesen werden. Dies bestätigt die hohe Stabilität von Biofilmen gegenüber äußeren Einflüssen wie Antibiotika.

Die verschiedenen Wirkstoff-Interaktionen in Bezug auf die zwei Modellbiofilme können an der unterschiedlichen Zusammensetzung der extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) sowie an der Molekülgröße und der Ladung der Wirkstoffe bei neutralem pH-Wert liegen. Bei *P. fluorescens* wurden in der Biofilmmatrix mehr Oberflächenproteine und weniger Exopolysaccharide als bei *P. aeruginosa* nachgewiesen. Demnach könnten die Wirkstoffe in dem *P. aeruginosa*-Biofilm von

den Exopolysacchariden besser zurückgehalten werden, sodass Konzentrationsunterschiede im Vergleich zum *P.-fluorescens*-Biofilm eher nachweisbar waren. In dem *P.-fluorescens*-Biofilm wurde dagegen ein Transformationsprodukt von TYL A gebildet.

Neben SDZ wurden Stabilitätsuntersuchungen des SO₂-extrudierten SDZ durchgeführt, da dessen chemische Eigenschaften nur wenig charakterisiert sind. Das SO₂-extrudierte SDZ kann unter anderem durch Photodegradation aus SDZ in der Umwelt entstehen und zeigte im Versuchszeitraum von 3 Wochen eine hohe Stabilität bei verschiedenen pH-Werten und Temperaturen auf. Es konnte keine antibiotische Aktivität bis 200 µg/L gegenüber dem Testkeim *Geobacillus stearothermophilus* im Brillantschwarz-Reduktionstest nachgewiesen werden. Dies könnte bei einer SO₂-Extrusion von SDZ für die Organismen in der Umwelt im Vergleich zu SDZ vom Vorteil sein. Zusätzlich wurde der *P.-fluorescens*-Modellbiofilm mit SO₂-extrudiertem SDZ konfrontiert und eine Acetylierung des Produkts nachgewiesen. Hervorzuheben ist, dass SDZ durch den Biofilm nicht transformiert wird, jedoch sein SO₂-extrudiertes Transformationsprodukt.

Im Projektverbund der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU) wurden neue Arzneimittelformulierungen mit SDZ und TMP hergestellt, um eine höhere Bioverfügbarkeit der Wirkstoffe zu erzielen. Da der reduzierende Zucker Lactose als Formulierungsstoff eingesetzt wurde, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Stabilität der Formulierung überprüft werden. Es konnte gezeigt werden, dass während einer Lagerung in Lösungen mit pH-Werten 2 und 10 ein Addukt aus Lactose und SDZ gebildet wird. Dieses Produkt befindet sich in einer Gleichgewichtsreaktion. In saurer Lösung betrug die Produktmenge konstant 2 %. Unter neutralen und alkalischen Bedingungen stieg der Gehalt dagegen auf 14 %. Da das Gleichgewicht unter sauren Bedingungen auf Seiten der Reaktionspartner liegt, würde sich das Produkt im Magen wieder in Lactose und den Ausgangsstoff SDZ umwandeln und könnte somit wieder seine antimikrobielle Wirksamkeit entfalten. Bei der Verwendung von Glucose als reduzierender Zucker konnte ebenfalls ein neues Produkt mittels HPLC-UV nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können in verschiedenen Bereichen von hohem Nutzen sein. Unter anderem können die Stabilitätsuntersuchungen auf relevante Umweltbedingungen (verschiedenen Eisenkonzentrationen, Modell-Brunnenwasser) erweitert werden. Das Modellbiofilmsystem kann ein guter Ansatz sein, um Veterinärantibiotika bei der Zulassung umfassender zu bewerten. Dies ist ein praktikabler Weg, um stoffliche Veränderungen und die damit verbundenen Transformationsprodukte schnell zu erkennen. Daraufhin könnte gezielt in der Umwelt nach diesen Verbindungen gesucht werden. In Bezug auf die SO₂-Extrusion des SDZ könnten weitere Sulfonamide nach Extrusion systematisch auf die Verringerung der antibiotischen Aktivität und auf ein möglicherweise verbleibendes Potential der Resistenzentwicklung untersucht werden. Dies würde die Kenntnisse zu möglichen Umweltproblematiken und -auswirkungen durch Tierarzneimittel vervollständigen.

2 Abstract

In animal husbandry, drugs can be administered in addition to feed medication via the drinking water lines. Biofilms are able to attach to drinking water pipes and possess a high tolerance to external influences such as antibiotics. Due to the high use of antibiotics in veterinary medicine, many antibiotics get into the environment partly unmetabolized. The persistence of many active substances as well as their trace concentrations can induce antibiotic resistance in bacteria. This development of resistance can in turn affect antibiotics used in human medicine and their effect on humans. Therefore, the use of antibiotics should be reduced to a necessary minimum. In order to understand the mechanisms of resistance development, entry pathways and possible transformations of the active substances must be elucidated. Only in this way antibiotics can be used in a targeted manner in the future and a risk assessment can be carried out with regard to resistance development. In context of these aspects, the aim of this work was first to perform stability studies of sulfadiazine (SDZ) and trimethoprim (TMP), to produce a model biofilm reproducibly and to reveal interactions between the biofilm and the antibiotics SDZ, TMP and tylosin A (TYL A).

SDZ and TMP could be detected almost unchanged over a period of 15 months in various aqueous solutions. The long shelf life is an important indication of the high stability and residence time of the active ingredients in the environment. The effect of an iron solution on the drug stability showed that the SDZ and TMP concentrations decreased by 10 % and 12 %, respectively, when exposed to light at 10 mg/L. Decrease of active ingredient concentration in water with high iron concentration may be relevant in drug administration in well water, as it is commonly performed in agriculture.

In this work, a model biofilm from the biofilm-forming *Pseudomonas (P.) fluorescens* and the antibiotic susceptible *Escherichia (E.) coli* was successfully produced reproducibly in a PVC pipe. The results of this model biofilm were compared with model biofilm from *P. aeruginosa* and *E. coli* developed in parallel by the project partner of German Federal Environmental Foundation (Deutsche Bundesstiftung Umwelt, DBU). After confrontation of both model biofilms with SDZ and TMP, biofilm density and composition did not change for both strains. In contrast, a change in biofilm morphology due to cell cluster formation could be imaged using a light microscope image. For the active ingredients SDZ and TMP, concentration in the biofilm tube was lower than in the abiotic control sample. For the model biofilm with *P. aeruginosa* the difference of SDZ was between 2 and 7 % and in the model biofilm with *P. fluorescens* it was approximately 1 %. For TMP, a concentration difference of 2 % was determined for both model biofilms. This could indicate rapid sorption to or diffusion into the biofilm, both known tolerance mechanisms of biofilms.

Confronting the model biofilms with macrolide TYL A, an unexpected reduction in the cell content in the biofilm could be determined for all strains. In addition, cell cluster formation was also detected on a PVC coupon. In the experiment with the *P. aeruginosa* model biofilm, TYL A could be determined at 3% lower concentration in the biofilm tube, so this indicated sorption to or diffusion into the biofilm, as with SDZ and TMP. In the model biofilm with *P. fluorescens*, no difference in initial concentrations between biofilm and control sample could be determined. Instead, a new constantly increasing peak could be detected in UV-chromatogram of biofilm sample. Since the TYL A peak decreased progressively during the same period, a transformation product (TP) of TYL A was suspected. In further investigations with a longer confrontation period, three other TPs with the same mass-to-charge ratio (m/z) were detected. Due to the instability of the TP, the products could not be isolated via HPLC procedures for NMR measurement. Therefore, only the exact mass from HR-MS measurements and fragmentation patterns could be used as structural evidence. The molecular formula with the smallest deviation resulted in the addition of H_2SO_3 (m/z 82) to TYL A, which could represent reductive sulfonation of TYL A. However, this type of transformation has not been previously reported for bacteria. The phosphorylation of TYL A known in the literature could be excluded by ^{31}P -NMR.

Using MS imaging, the spatial distribution of the model biofilm with *P. fluorescens* on a PVC coupon could be visualized using two m/z assigned to the phospholipids. The phospholipid distribution agreed well with the distribution of bacteria in light microscope images. The experiments performed here were the first to study a biofilm in contact with antibiotics under the conditions in a drinking water tube. SDZ and TMP could be imaged uniformly on the biofilm coupon at the sites with phospholipids and were not detected on the areas with high bacterial density. Thus, they could have penetrated into the biofilm and would not be detectable in the upper layer, which MALDI only records. In contrast, TYL A could only be detected at the intensive sites of the phospholipids, which in comparison corresponds for sorption to the biofilm.

After the confrontation of the active ingredients used here, no resistance development could be detected for the antibiotic-sensitive *E. coli* in both model biofilm by determining the minimum inhibitory concentration. This confirms the high stability of biofilms to external influences such as antibiotics.

The different drug interactions in relation to the two model biofilms may be due to the different composition of the extracellular polymeric substances (EPS) as well as the molecular size and charge of the antibiotics at neutral conditions. In *P. fluorescens*, more surface proteins and fewer exopolysaccharides were detected in the biofilm matrix than in *P. aeruginosa*. Accordingly, the active ingredients in the *P. aeruginosa* biofilm could be better retained by the exopolysaccharides, so that concentration differences were more detectable compared to the *P. fluorescens* biofilm. In contrast, a transformation product of TYL A was formed in the *P. fluorescens* biofilm.

In addition to SDZ, stability studies of the SO₂-extruded SDZ were conducted because its chemical properties are poorly characterized. The SO₂-extruded SDZ can be formed SDZ in the environment by photodegradation, among other processes and possesses high stability at different pH values and temperatures in the experimental period of three weeks. No antibiotic activity could be detected up to 200 µg/L against the test germ *Geobacillus stearothermophilus* in the brilliant black reduction test. This could be beneficial for the organisms in the environment in a SO₂ extrusion of SDZ compared to SDZ. Additionally, *P. fluorescens* model biofilm was confronted with SO₂-extruded SDZ resulting in acetylated transformation product. It should be emphasized that SDZ is not transformed by the biofilm, but its SO₂-extruded product is.

In the project network of DBU, new drug formulations with SDZ and TMP were produced in order to achieve higher bioavailability of the active ingredients. Since the reducing sugar lactose was used as a formulation material, the stability of the formulation was to be tested as part of this work. During the storage in different solutions with pH values, 2, 7 and 10 an adduct is formed from lactose and SDZ. This adduct is in an equilibrium reaction. In acidic solution, the amount of product was constant 2 %. In contrast, in neutral and alkaline conditions, the content increased to 14 %. Since balance under acidic condition is on the side of the reactants, product would convert back to lactose and the parent substance SDZ in the stomach and could thus regain its antimicrobial activity. When glucose was used as a reducing sugar, a new product was also detected by HPLC-UV.

The results of this work can be great use in various fields. The stability studies can be extended to other relevant environmental conditions, such as those occurring in the environment or in analytical applications (different iron concentrations, model well water). The model biofilm system can be a good approach to evaluate veterinary antibiotics more comprehensively during registration. This is an easy way to quickly identify substance changes and associated transformation products. Subsequently, targeted environmental searches for these compounds could be conducted. Regarding the SO₂-extrusion of the SDZ, further sulfonamides could be systematically evaluated after extrusion for reduction in antibiotic activity and for any remaining potential for resistance development. This would complete the knowledge on potential environmental issues and impacts from veterinary drugs.

3 Einleitung und Zielstellung

3.1 Veterinärantibiotika in der Tierhaltung und Umwelt

Antibiotika werden bei der Behandlung von bakteriellen Infektionskrankheiten in der Human- und Tiermedizin eingesetzt. Im Veterinärbereich leisten sie einen Beitrag zum Tierschutz und zur Tiergesundheit (Wallmann *et al.*, 2020). Tierarzneimittel werden oral, parenteral, intramammär, intrauteriner oder durch andere Anwendungen verabreicht (Wallmann *et al.*, 2020). In der intensiven Tierhaltung ist eine individuelle Behandlung schwierig, weil nicht alle kranken Tiere identifiziert werden können. Aus diesem Grund erfolgt unter anderem bei der Schweine- und Geflügelhaltung die Verabreichung über das Futter oder über das Tränkwassersystem und somit eine Behandlung des gesamten Stallbestandes oder der einzelnen Kohorte (Richter *et al.*, 2009). Über das Tränkwasser können viele Tiere schnell und gleichzeitig behandelt werden (Vermeulen *et al.*, 2002). Weitere Vorteile sind die einfache Anwendung sowie die geringen Kosten. Für das Verabreichen der Arzneimittel über die Tränkwasserleitung müssen die Formulierungen auf ihre Stabilität geprüft werden. Dabei ist von Bedeutung, dass die Wirkstoffe und Hilfsstoffe während der Anwendung unter anderem nicht im Leitungssystem ausfallen und nicht mit den Wasserinhaltsstoffen sowie mit dem Leitungsmaterial interagieren, was durch die verschiedenen Phasen im Zulassungsverfahren ausgeschlossen werden muss (Freissmuth *et al.*, 2020).

Von 2011 bis 2021 mussten auf Grundlage des Arzneimittelgesetzes (§ 47 Abs. 1c AMG, in der vor dem 28.01.2022 geltenden Fassung) und seit 2022 auf Grundlage des Tierarzneimittelgesetzes Daten zu Antibiotikaabgabemengen in Deutschland erhoben werden (TAMG, 2021). Seit 2022 werden die Datenerfassung und Auswertung im Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) durchgeführt (Sander *et al.*, 2022). Ziel der Erfassung war und ist es eine Datengrundlage zu schaffen, um eine mögliche Verknüpfung zwischen der Antibiotikaanwendung und der Resistenzentstehung nachzuvollziehen (Wallmann *et al.*, 2013).

Seit der Erfassung ist die Gesamtmenge der Antibiotikaabgabe von 1.706 t im Jahr 2011 auf 540 t im Jahr 2022 zurückgegangen und hat sich somit um 68 % (- 1.166 t) reduziert (Abbildung 3.1) (Klabunde-Negatsch *et al.*, 2023). Dies ist ein Rückgang von 10,1 % (- 61 t) im Vergleich zum Vorjahr 2021. Die vorherige prozentuale Reduzierung von 2021 zu 2020 betrug 14,3 %, was seit 2016 die deutlichste Abnahme der Abgabemengen (- 100 t im Vergleich zum Vorjahr, - 14 %) war.

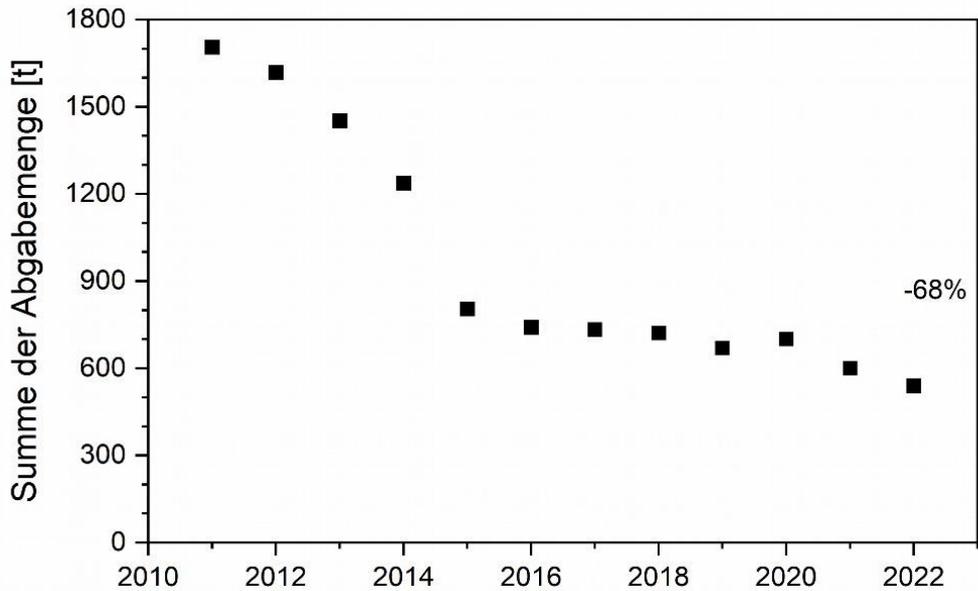


Abbildung 3.1: Summe der Antibiotikaabgabemenge (bezogen auf die jeweilige Grundsubstanz) in Deutschland in den Jahren 2011 bis 2022; prozentuale Angabe gibt die Reduktion im Vergleich zum Jahr 2011 an (Klabunde-Negatsch *et al.*, 2023).

Die größten Abgabemengen entfielen 2022, wie in den Vorjahren, auf die Substanzklassen der Penicilline (228 t) und Tetrazykline (90 t). Daraufhin folgten Sulfonamide (54 t) und Makrolide (46 t). Sulfonamide werden häufig zusammen mit dem Folsäureantagonisten Trimethoprim (TMP) eingesetzt, dessen Einsatzmenge im Jahr 2022 7,6 t betrug. Für die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika konnte 2022 eine Reduktion um 71 % für Sulfonamide, 75 % für Folsäureantagonisten bzw. 73 % für Makrolide im Vergleich zu 2011 erfasst werden (Abbildung 3.2). Der Einsatz von Penicillinen konnte um 57 % und von Tetrazyklinen um 84 % reduziert werden.

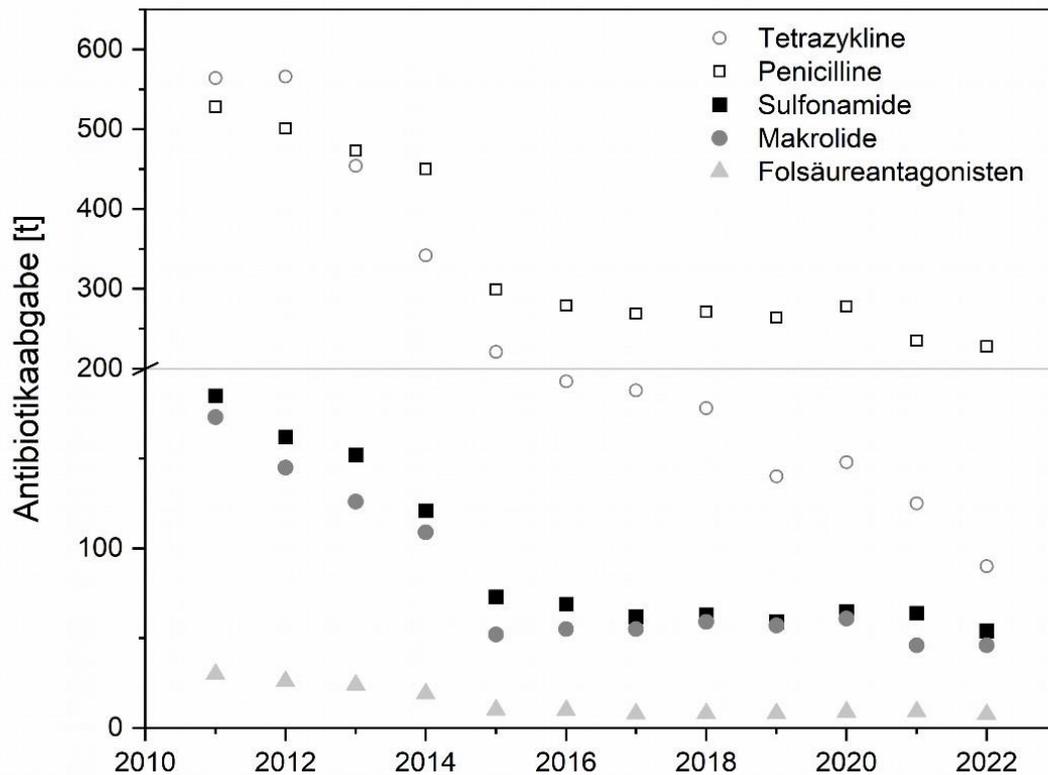


Abbildung 3.2: Antibiotikaabgabemengen von Tetrazyklinen, Penicillinen, Sulfonamiden, Makroliden und Folsäureantagonisten im Zeitraum von 2011 bis 2022 (Klabunde-Negatsch *et al.*, 2023).

Die anfängliche Reduzierung der Abgabemengen konnte zunächst als Erfolg bewertet werden. Zwischen 2015 und 2020 stagnierten die Zahlen bzw. nahmen im Falle der Makrolide wieder zu. Die Daten von 2021 und 2022 zeigten eine weitere Abnahme der Antibiotika-Abgabemengen, die durch die vorherige Stagnation so nicht erwartet wurden. Bei den Makroliden ist der hohe Rückgang der Abgabe (-25 % von 2020 zu 2021) besonders erwähnenswert, da diese Antibiotikaklasse aus der aktuellen Einstufung der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization, WHO) zu der Gruppe der „highest priority critically important antimicrobials“ gehören (Sander *et al.*, 2022; WHO, 2019). Das bedeutet, dass diese Antibiotikaklasse wegen ihrer hohen Bedeutung in der Humanmedizin nur sehr beschränkt im Veterinärbereich zum Einsatz kommen soll (Wallmann *et al.*, 2020). Im Jahr von 2022 zu 2021 blieben die Abgabemengen von Makroliden auf stabilem Niveau (Klabunde-Negatsch *et al.*, 2023).

Eine Zuordnung zur Tierart wurde in den bisherigen Statistiken nicht erfasst, was sich mit der seit 28.01.2022 gültigen neuen EU-Tierarzneimittelverordnung änderte (VO (EU) 2019/6). Das Tierarzneimittelgesetz (TAMG, 2021) setzt die neue EU-Tierarzneimittelverordnung ins nationale Recht um, in dem nach § 56 TAMG Tierärzte seit 2023 verpflichtet sind, die Antibiotika-Verbrauchsmengen nach Tierart getrennt für Rinder, Schweine, Hühner und Puten halbjährlich zu melden. Erste Auswertungen zur tierartspezifischen Antibiotikaverbrauchsmenge und Therapiehäufigkeiten in zur Fleischerzeugung gehaltenen Rinder, Schweinen, Hühnern und Puten

wurden am 22.12.2022 durch das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) für den Zeitraum von 2018 bis 2021 veröffentlicht (BfR, 2022).

Bei tierartspezifischen Betrachtungen der Therapiehäufigkeiten finden bei Masthühnern und -puten die häufigsten Antibiotikaaanwendungen statt (BfR, 2022), gefolgt von Mastkälbern und -ferkeln. Schlusslicht waren Mastschweine und -rinder. Im Betrachtungszeitraum von 2018 bis 2021 konnte kein einheitlicher rückläufiger Trend für die Therapiehäufigkeit im Gegensatz zu den Antibiotikagesamtabgabemengen je Nutzungsart festgestellt werden. Für Mastputen, -ferkel und -schweinen sank die Therapiehäufigkeit, wobei sie für Masthühner und -kälber stieg. Bei Mastrindern konnte im Zeitraum keine Veränderung festgestellt werden.

Beim Vergleich der Gesamtverbrauchsmengen, Therapiehäufigkeit und der Entwicklung von Antibiotikaresistenzen zeigte letzteres in den Jahren 2014 bis 2021 erfreulicherweise häufiger einen Resistenzrückgang als einen -anstieg, wobei kein Zusammenhang zwischen höchster Verbrauchsreduzierung an Wirkstoff mit der zugehörigen spezifischen Resistenz hergestellt werden konnte (BfR, 2022; BVL und BfR, 2022). Der Trend zur Reduzierung der Antibiotikaverbrauchsmenge zur Verringerung der Resistenzentwicklung muss weiter gefordert und gefördert werden, das auch auf europäischer Ebene im Green Deal formuliert wurde (Europäische Kommission, 2020). Mit der From-Farm-to-Fork-Strategie („vom Hof auf den Tisch“) soll 2030 der Gesamtumsatz an antimikrobiellen Mitteln um 50 % im Vergleich zu 2020 reduziert werden.

Antibiotika werden je nach Tierart zu 40 – 90 % unverändert oder auch in biologisch aktiver Form wieder ausgeschieden, sodass die aktiven Stoffe in die Gülle gelangen (Hamscher *et al.*, 2002; Kemper, 2008). Hamscher *et al.* konnten 2002 schon zeigen, dass durch das Ausbringen der Gülle als Wirtschaftsdüngers Antibiotika in den Boden eingetragen werden und sich in der Umwelt verteilen (Spielmeyer *et al.*, 2017, 2020). Neben der möglichen Toxizität der Wirkstoffe gegenüber den in der Umwelt vorkommenden Bakterien und die damit verbundene Problematik, bakterielle Prozesse im Ökosystem zu stören (Baumann *et al.*, 2015; González-Pleiter *et al.*, 2013; Isidori *et al.*, 2005), können auch schon geringe Antibiotikakonzentrationen Resistenzen fördern (Costanzo *et al.*, 2005). Die verschiedenen Resistenzmechanismen werden in Kapitel 3.4 ausführlich beschrieben.

Als Beispiel für die Verbreitung von Antibiotika in der Umwelt ist in Tabelle 3.1 eine Übersicht über die Antibiotikagehalte in verschiedenen Gewässern aus Europa dargestellt (Carvalho & Santos, 2016). Es wird nur auf die in dieser Arbeit verwendeten Wirkstoffgruppen der Makrolide, Sulfonamide und TMP eingegangen. Die Angaben in der Tabelle sind keine summierten Gehalte innerhalb der Wirkstoffgruppen, sondern Gehalte von Einzelwirkstoffen.

Tabelle 3.1: Antibiotikagehalte in der aquatischen Umwelt und Abwasser in Europa, bearbeitet entnommen aus (Carvalho & Santos, 2016).

Probenart	Gehalt [ng/L] *		
	Makrolide	Sulfonamide	TMP
Krankenhaus-Abfluss	1.000 – 14.000	nd – 13.000	nd – 7.600
Abwasser-Zufluss	nd – 26.600	nd – 11.600	nd – 6.800
Abwasser-Abfluss	nd – 12.300	nd – 2.000	nd – 3.000
Flüsse: Durchschnitt	nd – 500	nd – 300	nd – 870
Höchstwerte	1.000 – 17.000 (F,S)	500 – 5.000 (F,S)	
Grundwasser	nd – 154	nd – 3.400	
Trinkwasser	nd – 21	nd – 4	nd – 0,5
Meerwasser	nd – 164	nd – 94	nd – 151

* nd: Wirkstoff wurde nicht detektiert. F: Frankreich; S: Spanien.

Die Sulfonamide werden am häufigsten von allen Antibiotikaklassen in den verschiedenen Gewässertypen gefunden (Jafari Ozumchelouei *et al.*, 2020). Allgemein sind die Gehalte in Krankenhaus-Abflüssen und Abwässern aufgrund des Eintrags aus der Humanmedizin am höchsten. Sie nehmen unter anderem aufgrund von Verdünnungseffekten in Oberflächengewässern ab (Carvalho & Santos, 2016). Dabei muss beachtet werden, dass in dieser Übersicht und in vielen anderen Untersuchungen Transformationsprodukte und Metabolite durch Umwelteinflüsse, Tier und Mensch teilweise nicht erfasst werden. Deren ökotoxikologischen Auswirkungen können bisher noch nicht abgeschätzt werden (Majewsky *et al.*, 2015). Höchst-Konzentrationen von Antibiotika in der Umwelt sind bisher nicht gesetzlich geregelt. Das Umweltbundesamt empfiehlt einen Schwellenwert für Arzneimittel im Grundwasser in der Höhe des Schwellenwertes für Pflanzenschutzmittel einzuführen (Hannappel *et al.*, 2016). Nach Grundwasserverordnung (GrwV) würde dies für Einzelwirkstoffe einen Schwellenwert von 100 ng/L und als Summenwert aller Wirkstoffe mit allen relevanten Stoffwechsel-, Abbau- und Reaktionsprodukten 500 ng/L bedeuten (GrwV, 2010). Die vorgeschlagenen Schwellenwerte wurden in der aquatischen Umwelt bei allen drei betrachteten Wirkstoffklassen in Tabelle 3.1 in Europa überschritten. Für Sulfonamide konnten Werte im Grundwasser bis 3.400 ng/L bestimmt werden.

3.2 In dieser Arbeit verwendete Antibiotika

3.2.1 Sulfadiazin und Trimethoprim

Sulfadiazin (SDZ) gehört zu der Antibiotikaklasse der Sulfonamide, die bakteriostatisch wirken und synthetisch hergestellt werden (Tačić *et al.*, 2017). Das gemeinsame Strukturelement der Sulfonamide ist das Sulfanilamid mit der Sulfonamidgruppe und der Aminogruppe in *para*-Position am Benzolring (Abbildung 3.3). Es sind viele Derivate von Sulfonamiden durch Substitution des Wasserstoffs am Stickstoff der Sulfonamidgruppe (N_1) bekannt. Bei SDZ wird hier eine Pyrimidingruppe eingefügt.

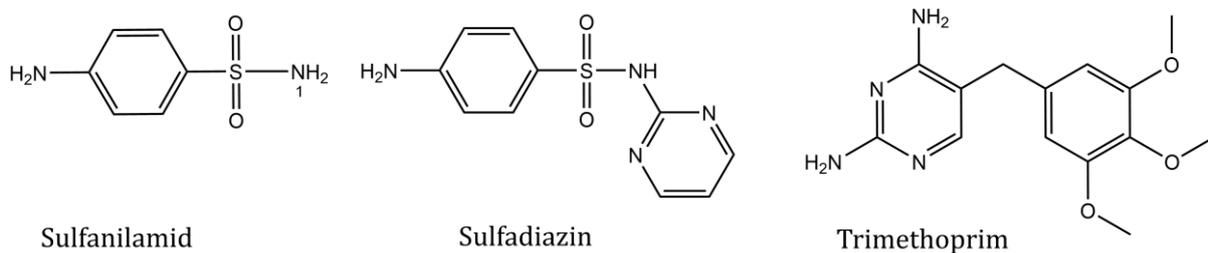


Abbildung 3.3: Struktur von Sulfanilamid, Sulfadiazin (SDZ) und Trimethoprim (TMP).

Sulfonamide greifen als Antagonist der *p*-Aminobenzoessäure in die bakterielle Folsäuresynthese ein. Folsäure wird als Cofaktor für die Purinsynthese benötigt. Purinderivate sind wichtige Bausteine in der DNA- und RNA-Synthese (Connor, 1998; Tačić *et al.*, 2017). Die Sulfonamide hemmen dabei reversibel die Dihydropteroat-Synthase, weshalb sie eine bakteriostatische Wirkung besitzen (Abbildung 3.4). Die Diaminopyrimidin-Gruppe des Trimethoprim (TMP) inhibiert die Dihydrofolsäurereduktase (Bushby & Hitchings, 1968). TMP wirkt synergistisch, weil es die Folsäuresynthese an einer anderen Stelle im Stoffwechsel inhibiert.

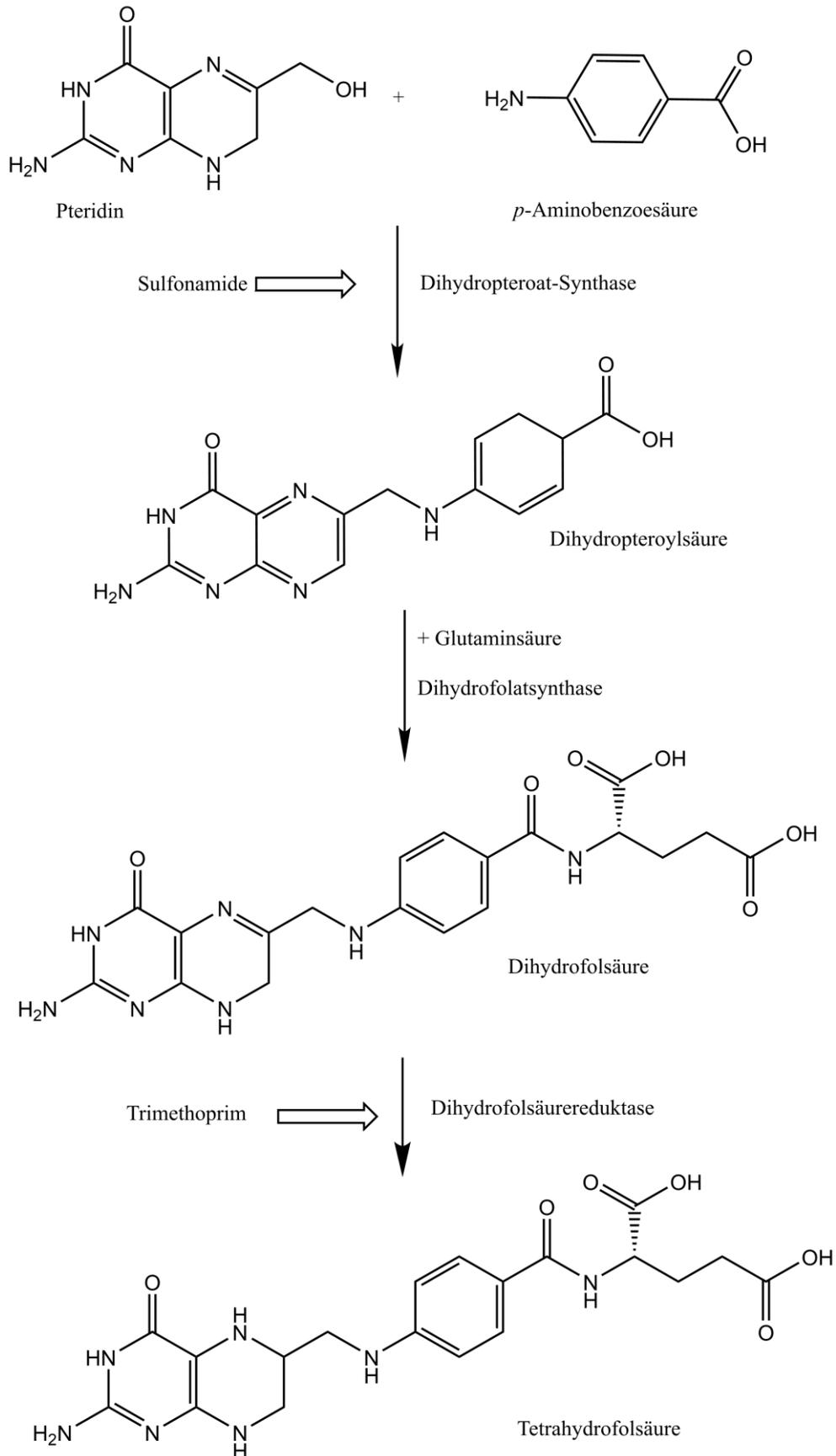


Abbildung 3.4: Mechanismus der bakteriellen Folsäuresynthese mit Kennzeichnung der Angriffspunkte von Sulfonamiden und TMP (Drews, 1980; Tačić *et al.*, 2017).

Sulfonamide und TMP sind Breitbandantibiotika. Sie wirken gegen grampositive und gramnegative Bakterien und werden häufig bei Harnwegsinfektionen eingesetzt (Prescott, 2013; Tačić *et al.*, 2017). Es wurde vermutet, dass die geringeren Einsatzmengen durch die Wirkstoffkombination zu einer geringeren Resistenzbildung beitragen als in der Einzelanwendung (Bushby & Hitchings, 1968; Prescott, 2013). Dies konnte durch bisherige Studien nicht eindeutig belegt werden, da auch in der Kombinationsanwendung die Resistenzentwicklung voranschritt (Eliopoulos & Huovinen, 2001; Reeves, 1982).

Sulfonamide werden zu 70 – 100 % resorbiert (Connor, 1998). Die Ausscheidungsrate beträgt abhängig von Tierart, Dosis und Applikationsart ~40 – 90 % (Sukul & Spittler, 2006). SDZ konnte in einem Fütterungsversuch mit ¹⁴C-markierten SDZ bei einem Schwein innerhalb von 10 Tagen fast vollständig in der Gülle nachgewiesen werden. Dabei gingen 44 % auf die Muttersubstanz und 52 % auf metabolisierte Formen (v.a. acetyliert und hydroxyliert) zurück (Lamshöft *et al.*, 2007). Die Acetylderivate werden wiederum in der Gülle gespalten, sodass der originäre Wirkstoff mit seiner biologischen Wirksamkeit vorhanden ist (Heuer *et al.*, 2008; Lamshöft *et al.*, 2010). TMP wird nach oraler Aufnahme fast vollständig resorbiert und zu 70 % unverändert renal wieder ausgeschieden (Reeves, 1982; Reeves & Wilkinson, 1979).

Sulfonamide gehören zu den persistenten organischen Schadstoffen in der Umwelt, da sie stabil gegenüber Biodegradation sind (Tačić *et al.*, 2017). Dennoch unterlaufen sie in den verschiedenen Umweltkompartimenten unterschiedliche Transformationswege. Diese können in biotische und abiotische Transformation unterschieden werden. Zur letzteren gehören die Hydrolyse, Photolyse oder Sorption. Zur biotischen zählen die Transformation durch Bakterien und Pilze. Obwohl in einigen Fällen die Transformation die antibiotische Aktivität im Vergleich zur Muttersubstanz verringert, sind andere Transformationsprodukte noch bioaktiv und antibiotisch wirksam, inert gegen verschiedene Einflüsse und haben ein entsprechendes Verbreitungspotential in der Umwelt (García-Galán *et al.*, 2008).

3.2.2 Tylosin A

Tylosin A (TYL A) gehört zu den Makroliden, besteht aus einem 16-gliedrigen Laktoring und wird von *Streptomyces fradiae* produziert (Gray & Vu-Trong, 1987; Omura & Nakagawa, 1975). Bei der Fermentation entsteht ein Gemisch aus Tylosin A, B, C, D und weiteren Minor-komponenten, wobei der Anteil an TYL A mehr als 80 % beträgt (Abbildung 3.5 und Tabelle 3.2, Arsic *et al.*, 2018; Paesen *et al.*, 1995).

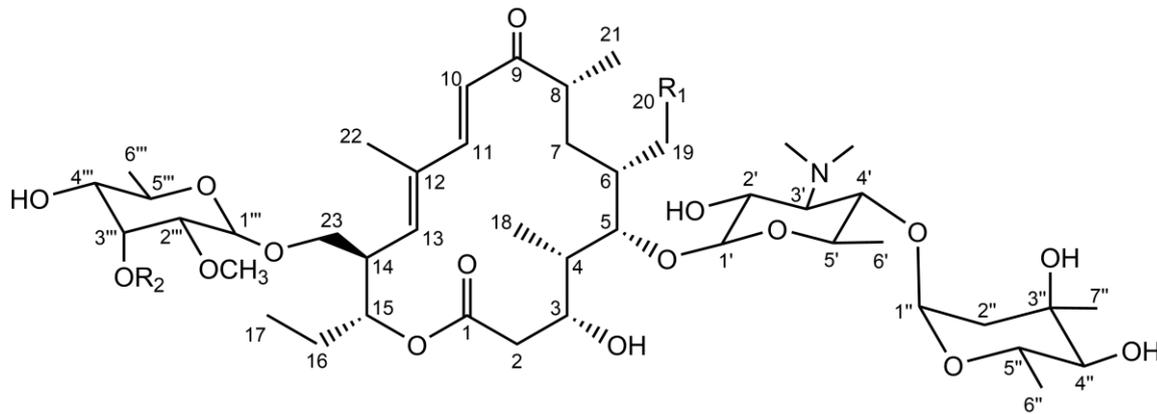


Abbildung 3.5: Struktur von Tylosin A mit $R_1 = \text{CHO}$ und $R_2 = \text{CH}_3$ mit den Zuckern Mycinose (links), Mycaminosose (2. Zucker von rechts) und Mycarose (rechts), nach Paesen *et al.* (1995).

Tabelle 3.2: Strukturbeziehungen zwischen den Tylosin-Metaboliten, nach Paesen *et al.* (1995).

Metabolit	R_1	R_2	Mycinose*	Mycarose*
Tylosin A	CHO	CH_3	+	+
Tylosin B	CHO	CH_3	+	-
Tylosin C	CHO	H	+	+
Tylosin D	CH_2OH	CH_3	+	+
Demycinosyltylosin (DMT)	CHO		-	+
5-O-Mycaminosyltylonolid (OMT)	CHO		-	-

* „+“ Zucker in der Struktur enthalten. „-“ Zucker nicht vorhanden.

Die bakteriostatische Wirkung von TYL A beruht auf der reversiblen Bindung an die 23S-rRNA der bakteriellen ribosomalen 50S-Untereinheit, das die Peptidyltransferase und somit die Proteinsynthese inhibiert (Arsic *et al.*, 2018; Dinos, 2017; Gaynor & Mankin, 2005). Die mikrobiologische Aktivität beträgt relativ zu TYL A 83 % für TYL B, 75 % für TYL C und 35 % für TYL D (WHO, 2009). TYL A ist aktiv gegen grampositive Bakterien und Mykoplasmen (WHO, 2009). Die geringere antibiotische Wirkung gegen gramnegative Bakterien liegt an deren äußerer Membran, da TYL A durch diese nicht permeieren kann (Arsic *et al.*, 2018).

3.3 Biofilme als Lebensform

Die bevorzugte Lebensform von Mikroorganismen ist der Biofilm (Flemming & Wingender, 2002). Im Vergleich zu einzelnen Zellen, die auch planktonische Zellen genannt werden, stellt der Biofilm eine Ansammlung von Mikroorganismen dar, die in einer selbst synthetisierten Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eingebettet ist (Flemming, 2011).

3.3.1 Biofilmentwicklung und Zusammensetzung der Biofilmmatrix

Biofilme können sich an Grenzflächen entwickeln, z.B. zwischen Wasser und festen Medien, zwischen Wasser und Luft sowie Feststoffen und Luft (z.B. Gestein, Flemming & Wingender, 2001) entstehen. Weiterhin können Biofilme als Flocken schwimmen oder in verdickter Form als Schlamm existieren. Voraussetzung zur Biofilmentstehung sind genügend Wasser, mikrobiell verwertbare Nährstoffe, eine Grenzfläche und spezielle Mikroorganismen. Biofilme sind weit verbreitet in der Natur, im medizinischen Bereich sowie in technischen Systemen (Costerton *et al.*, 1987). Auch Trink- und Tränkwasserleitungen sind an den Wänden und in der Wasserphase durch Mikroorganismen besiedelt (Block, 1992; Maes *et al.*, 2019; Wingender & Flemming, 2004). Da es an extreme Umgebungen adaptierte Mikroorganismen gibt, findet man Biofilme auch in lebensfeindlichen Territorien wie schwefelhaltige heiße Quellen, hypersaline und saure Seen, arktische und heiße Wüsten oder in technischen Bereichen wie Kühlkreisläufe und Elektroden (Flemming & Wingender, 2001).

Die Ausbildung eines Biofilms durchläuft mehrere Stadien (Abbildung 3.6). Planktonische Zellen besiedeln eine Oberfläche, wobei dieser Schritt reversibel sein kann. Raue und hydrophobe Oberflächen wie PVC werden leichter besiedelt als Glas- oder Metalloberflächen (Donlan, 2002). Im zweiten Schritt folgt die Produktion der EPS sowie ein irreversibles Anheften der Zellen an der Oberfläche. Daraufhin formt sich die komplexe Biofilmarchitektur (Schritt 3 und 4, Abbildung 3.6). Aus dem Biofilm können planktonische Zellen freigesetzt werden und an anderen Orten wieder einen Biofilm ausbilden.

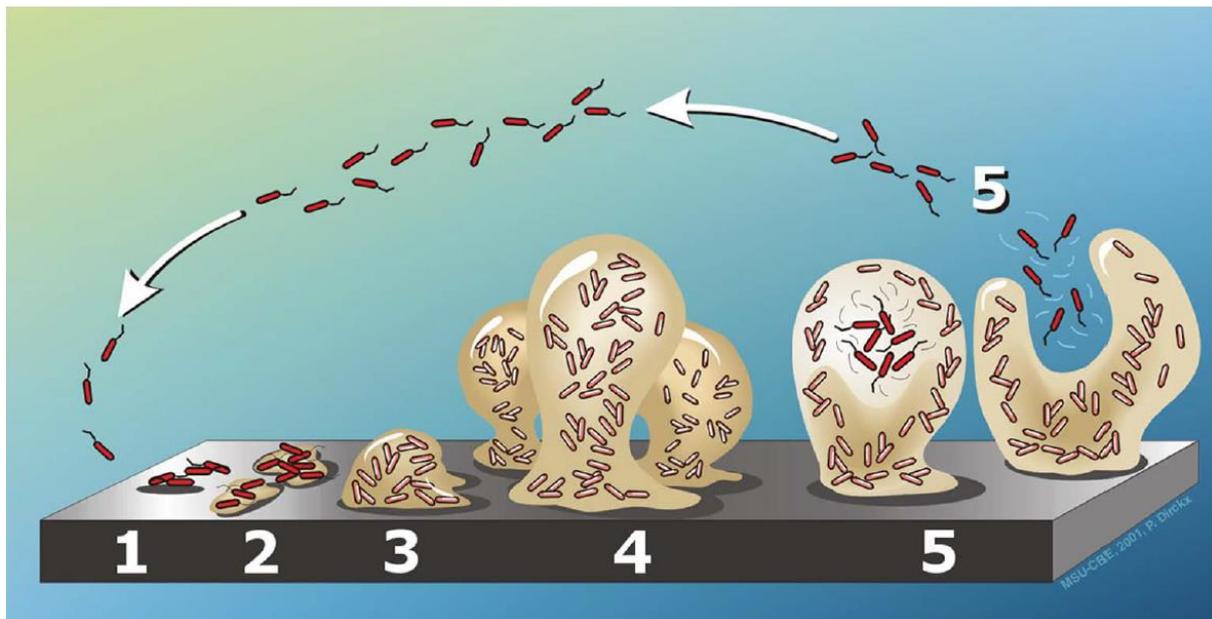


Abbildung 3.6: Biofilmentwicklung: Stufe 1: initiales Anheften von planktonischen Zellen an der Oberfläche, Stufe 2: Produktion von EPS und dadurch irreversible Anheftung an der Oberfläche, Stufe 3: frühe Entwicklung der Biofilmarchitektur, Stufe 4: Reifung der Biofilmarchitektur, Stufe 5: Ablösen von planktonischen Zellen aus dem Biofilm; nach Stoodley *et al.*, (2002), bearbeitet und entnommen aus Van Houdt & Michiels (2005).

Die Biofilmmatrix besteht aus Wasser und EPS wie Polysacchariden, Proteinen, extrazellulärer DNA und Lipiden (Flemming & Wingender, 2010). Sie gibt dem Biofilm Stabilität vor mechanischen Einflüssen und verleiht ihm eine räumliche Architektur mit Poren und Tunneln, füllt und formt den Raum zwischen den Zellen und lokalisiert Nährstoffe (Flemming *et al.*, 2016). Dabei kann die Matrix Gradienten u.a. für Sauerstoff und Nährstoffe innerhalb der Architektur führen und bietet somit Lebensraum für eine hohe Biodiversität (z. B. obligat Aerobier und Anaerobier).

3.3.2 Quorum Sensing

Eine Besonderheit in Biofilmen sind synergistische Interaktionen wie Zell-zu-Zell-Kommunikation und der horizontale Gentransfer. Die Kommunikation durch Sekretion von Signalmolekülen wird auch Quorum Sensing (QS) genannt (Flemming & Wingender, 2001; Rodis *et al.*, 2020; Waters & Bassler, 2005). Bakterienzellen bilden Signalmoleküle und scheiden sie aus, sodass andere Zellen diese aufnehmen können. Dies beeinflusst die Genkonzentration durch Auf- und Abregulierung und kann somit die Anpassung der Mikroorganismen an die jeweiligen Bedingungen ermöglichen. Bei einer hohen Zelldichte wird eine gewisse Schwellenkonzentration der Signalmoleküle überschritten, die spezifische Gene in allen Zellen zum gleichen Zeitpunkt anschaltet und zu physiologischen Veränderungen der Zellen führen kann.

Durch *N*-Acyl-Homoserinlaktone (AHL) werden unter anderem die Ausschüttung von extrazellulären Produkten wie Enzyme und Polysaccharide gesteuert. Bei einer erhöhten Ausschüttung

der Signalmolekülgruppe 4-Chinolone, wie *Pseudomonas*-Chinolone-Signal (PQS) und 2-Heptyl-4(1H)-Chinolone (HHQ), konnte eine vermehrte Produktion von Lektin, Pyocyanin und Rhamnolipiden bei *P. aeruginosa* nachgewiesen werden (Nadal Jimenez *et al.*, 2012). Die für Pseudomonaden charakteristischen Pigment-Signale, die Pyoverdine, werden unter Eisenmangel produziert, sodass sie Eisen aus der Umgebung komplexieren können (Budzikiewicz, 1997; Geisen *et al.*, 1992). Die diffusionsfähigen Signalfaktoren (DSF), wie die Fettsäure cis-11-Methyl-2-dodecensäure, nehmen Einfluss auf die Beweglichkeit der Zellen, Lipopolysaccharidproduktion und die Zellaggregation und können somit auch die Biofilmbildung kontrollieren (Nadal Jimenez *et al.*, 2012).

Der sekundäre Botenstoff zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) nimmt Einfluss auf verschiedene Virulenzfaktoren und regelt unter anderem Exotoxin A hoch und die Flagellengenexpression herunter. Ein weiterer Botenstoff, das zyklische Di-Guanosinmonophosphat (c-di-GMP), ist in vielen Spezies vorhanden und beteiligt an der Biosynthese von Adhäsinen und Exopolysacchariden und der Adaption bei Umweltbelastungen.

3.3.3 Bakterielle Biofilmbildner und Modellorganismen

Neben den Bakterien können auch Pilze (z.B. *Candida albicans*), Hefen (z.B. *Saccharomyces cerevisiae*), Archaeen und Algen Biofilme bilden (Chimileski *et al.*, 2014; O'Toole *et al.*, 2000; Reynolds & Fink, 2001; Schnurr & Allen, 2015). Im Fokus der Biofilmbildung liegen die bakteriellen Biofilme, da diese einerseits zuerst beschrieben wurden und andererseits deren klinische Relevanz u.a. im Zusammenhang mit Infektionen untersucht wird (O'Toole *et al.*, 2000). Beispiele für bakterielle Biofilmbildner sind die gramnegativen Bakterien *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* und *Haemophilus influenzae* sowie die grampositiven Bakterien *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* und Enterokokken (Flemming & Wingender, 2001; O'Toole *et al.*, 2000; Ruhul & Kataria, 2021).

Anfangs standen in der Forschung vor allem Biofilme aus einer Spezies im Vordergrund, da es unter anderem kontrollierter durchzuführen ist (O'Toole *et al.*, 2000; Tan *et al.*, 2017). Dabei ist der Biofilm aus *Pseudomonas aeruginosa* der am meist erforschte Single-Spezies-Biofilm, da er an einer Vielzahl von Infektionen beteiligt ist und auf der Oberfläche von medizinischen Implantaten zu finden ist (Flemming & Wingender, 2001; O'Toole *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2020). Wegen der Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Spezies innerhalb eines Biofilms rücken die Betrachtungen von Multi-Spezies-Biofilmen in den Fokus, da diese vor allem in der Umwelt vorkommen (James *et al.*, 1995; O'Toole *et al.*, 2000; Røder *et al.*, 2016).

In dieser Arbeit wird ein bakterieller Biofilm aus zwei Spezies hergestellt, die in den folgenden Unterkapiteln beschrieben werden.

3.3.3.1 Modellorganismus *Pseudomonas fluorescens* als Biofilmbildner

P. fluorescens ist ein bewegliches, obligatorisch aerobes gramnegatives Bakterium, das ubiquitär in der Umwelt im Boden, Wasser und Pflanzen vorkommt (Donnarumma *et al.*, 2010). Die optimale Wachstumstemperatur liegt zwischen 25 und 30 °C. Dabei kann es sich auch bei 4 °C vermehren, weshalb es zu den psychrotrophen Bakterienarten gehört (Gonçalves *et al.*, 2017). Die Pseudomonaden gehören zu den Nonfermentern, da sie Glucose nicht umsetzen können (Scales *et al.*, 2014; Zanetti *et al.*, 2014). Für viele *Pseudomonas*-Arten konnte gezeigt werden, dass sie gegenüber zahlreichen Antibiotikaklassen (z. B. Aminoglykoside, Chinolone und β -Lactame) natürlicherweise resistent sind (Hancock & Speert, 2000; Meng *et al.*, 2020; Pang *et al.*, 2019).

Die Produktion von fluoreszierenden Pigmenten, den sogenannten Pyoverdinen, gehört zu den Besonderheiten von Pseudomonaden wie *P. fluorescens* und *P. aeruginosa* (Scales *et al.*, 2014). Pyoverdine bestehen aus einem Chinolin-Derivat als Chromophor und einer Peptidkette (Linget *et al.*, 1992). Sie sind Siderophore, die eine hohe Affinität zu Eisen haben und es somit aus der Umgebung anreichern können. Somit sind Pseudomonaden bei Eisenmangel beständiger als andere Gattungen von Mikroorganismen.

P. fluorescens kommen unter anderem in Trinkwasserleitungen vor und können Biofilme bilden (Fazli *et al.*, 2014; Penna *et al.*, 2002). Die Biofilmbildung wird durch den sekundären Botenstoff c-di-GMP, kleiner RNA (small RNA, sRNA) und dem QS reguliert (Fazli *et al.*, 2014). Dabei wird die Produktion von Exopolysacchariden und Oberflächenproteinen durch c-di-GMP gesteuert. Die weitere Exopolysaccharidproduktion wird auch durch sRNA beeinflusst. Durch das QS-System anhand von z.B. Acylhomoserinlaktonen (AHL) werden in Pseudomonaden extrazelluläre DNA, Lektin und Biotenside reguliert.

3.3.3.2 Modellorganismus *Escherichia coli* als Biofilmbildner

Escherichia (E.) coli gehört zu den gramnegativen Enterobakterien (Suerbaum *et al.*, 2020). Es ist fakultativ anaerob und mesophil mit einem Wachstumsoptimum bei 37 °C. Bei dieser Temperatur hat es eine Generationszeit von 20 min. *E. coli* kommt vor allem im Darm von Menschen und Tieren vor. Obwohl es nur 1 % der gesamten Darmbakterien ausmacht, ist er der klassische Indikatorkeim für fäkale Kontamination. Außerhalb des Wirts konnte *E. coli* in Trinkwasserleitungen bis 3 Monate überleben (Edberg *et al.*, 2000).

Die Resistenzbildung von *E. coli* ist stark ausgeprägt und gilt deshalb als Marker für die Antibiotikanutzung bei Tier und Mensch und die darauffolgende Verbreitung in der Umwelt (van den Bogaard & Stobberingh, 2000). Die Zahl der Resistenzen und vor allem der Multiresistenzen hat sich auch bei *E. coli* in den letzten Dekaden stark erhöht (Caruso, 2018). Dabei wurden die höchsten Resistenzprävalenzen für Ampicillin-, Streptomycin-, Sulfonamid- und Tetrazyklin-

Antibiotika (auch kombiniert in mehreren Multiresistenzmustern), insbesondere bei Geflügel und Schweinen, mit Werten zwischen 29,5 und 54,7 % gefunden.

Die Biofilmbildung von *E. coli* ist in der Literatur ausführlich beschrieben (Sharma *et al.*, 2016). Dabei verhalten sich die einzelnen Stämme unterschiedlich. Manche Stämme wachsen nur unter Minimalbedingungen mit geringem Nährstoffangebot, andere zeigen dabei kein Wachstum (O'Toole *et al.*, 2000). Die Genregulation zur Biofilmbildung erfolgt unter anderem über c-di-GMP und auch dem QS (Sharma *et al.*, 2016). Hierbei werden aber keine AHL als Signale produziert, sondern der Autoinducer-2 (AI-2) (Van Houdt & Michiels, 2005). *E. coli* kann auf verschiedenen abiotischen Oberflächen wie Glas, Plastik oder Metall unter verschiedenen Fließbedingungen und biotischen Flächen wie Epithelzellen, Haut und Tiergeweben Biofilme ausbilden (O'Toole *et al.*, 2000; Oder *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2016). Für *E. coli* konnte keine „minimale Biofilm vernichtende Konzentration“ (minimum biofilm eradication concentration, MBEC) durch die Konfrontation mit einer Trimethoprim-Sulfadoxin-(1:5)-Lösung (>1024 mg/L) bestimmt werden (Olson *et al.*, 2002).

3.4 Resistenzmechanismen und -entwicklung in der Umwelt

Jede Antibiotikaaanwendung fördert die Bildung von Antibiotikaresistenzen. Dies wird vor allem dadurch verdeutlicht, dass kurz nach Entdeckung und Einführung eines neuen Antibiotikums oder einer neuen Antibiotikaklasse (z. B. Penicillin, Aminoglycoside, Makrolide) darauf resistente Keime auftraten (Aarestrup, 1999; Högberg *et al.*, 2010). Die Geschwindigkeit der Resistenzentstehung variiert dabei nach Wirkstoff und Erreger (Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina, 2012). Durch den hohen Verbrauch an Antibiotika in der Human- und Tiermedizin konnten sich Antibiotikaresistenzen schnell verbreiten (WHO, 2011). In der Europäischen Union sterben jährlich 25.000 Menschen an Krankheiten mit antibiotikaresistenten Keimen, weshalb die Ausbreitung der resistenten Krankheitserreger verringert werden sollte (WHO, 2011).

Einerseits trägt zur Verbreitung von Resistenzen der hohe Einsatz von Antibiotika bei, andererseits kann potenziell jede Antibiotikabehandlung eine Resistenzbildung fördern. Antibiotisch wirksame Verbindungen üben einen Selektionsdruck auf Bakterien aus (Chow *et al.*, 2021). Durch entsprechend hohe Wirkstoffkonzentrationen werden die meisten Bakterienzellen abgetötet und nur die Zellen überleben, die zuvor Resistenzen entwickeln konnten (siehe oben). Die Selektion erfolgt am Ort mit der höchsten Wirkstoffkonzentration, wo der Erwerb einer Resistenz überlebensnotwendig ist.

Eine weitere Vermutung ist, dass auch Konzentrationen unter der minimalen Hemmkonzentration, sogenannte subinhibitorische Konzentrationen, Resistenzen fördern können (Andersson &

Hughes, 2014). Antibiotika werden von Tieren und von Menschen zum großen Teil unverändert ausgeschieden werden (Kapitel 3.1). Standardverfahren in der Abwasserbehandlung können die Wirkstoffe in den meisten Fällen nicht entfernen. Durch den Einsatz von Gülle als Wirtschaftsdünger werden Antibiotika und ihre Transformationsprodukte in die Umwelt freigesetzt. Aus diesen Gründen finden sich in den verschiedenen Umweltkompartimenten subinhibitorische Konzentrationen von Antibiotika wieder. Dort können sich daraufhin Antibiotikaresistenzen entwickeln und verbreiten (Chow *et al.*, 2021).

Subinhibitorische Konzentrationen an Antibiotika wirken sich auf mindestens drei verschiedene Ebenen bei Bakterien aus: als Resistenzselektoren (durch Anreicherung bereits vorhandener resistenter Bakterien), als Generatoren genetischer und phänotypischer Variabilität (durch Erhöhung der adaptiven Evolutionsrate, einschließlich der Resistenzentwicklung) und als Signalmoleküle, wobei diese verschiedene physiologische Aktivitäten (Virulenz, Biofilmbildung und Genexpression) beeinflussen können (Andersson & Hughes, 2014).

3.4.1 Einteilung der Antibiotikaresistenzen

Antibiotikaresistenzen können in intrinsische und erworbene Resistenzen unterteilt werden (Schwarz & Chaslus-Dancla, 2001; Ziesing & Fille, 2020). Erstere beruht auf einer vorhandenen, genetisch bedingten Unempfindlichkeit einer Bakterienart gegenüber einem Antibiotikum. Dabei können das Fehlen einer Zielstruktur oder die Struktur der Bakterienhülle die möglichen Ursachen sein, sodass der Wirkstoff nicht mehr an seinen Wirkort gelangen kann. Die erworbene Resistenz entsteht entweder durch Mutation oder durch Aufnahme von (Fremd-)DNA, die einen Resistenzfaktor kodiert (horizontaler Gentransfer, Ziesing & Fille, 2020).

Es gibt verschiedene erworbene Mechanismen, wie Bakterien gegenüber Antibiotika resistent reagieren können (Reygaert, 2018; Schwarz & Chaslus-Dancla, 2001). Vor allem die enzymatische Inaktivierung des Antibiotikums (Beispiel: β -Lactamasen), die reduzierte intrazelluläre Akkumulation des Antibiotikums (verringerte Aufnahme oder erhöhtes Ausschleusen des Wirkstoffes mittels Efflux-Pumpen) und Schutz oder Veränderung der zellulären Zielstrukturen sind dabei zu nennen.

3.4.2 Spezifische Resistenzmechanismen gegenüber SDZ, TMP und Makroliden

Bei den Sulfonamiden gehen Resistenzen u.a. auf Mutation des Enzyms Dihydropteroat-Synthase zurück. Dadurch wird das Binden des Sulfonamids an die Untereinheit verhindert, das zelleigene Molekül *p*-Aminobenzoessäure kann jedoch weiterhin mit dem Enzym interagieren (Sköld, 2000). Darüber hinaus konnte eine Beeinträchtigung der Sulfonamidaufnahme in die Zelle als Resistenz nachgewiesen werden sowie eine Überproduktion von *p*-Aminobenzoessäure (Prescott, 2013). Durch die strukturelle Ähnlichkeit der Sulfonamide untereinander (Kapitel 3.2.1) tritt in der Regel

eine Kreuzresistenz auf. Dies bedeutet, dass bei einer Resistenzbildung gegenüber einem Sulfonamid die Resistenz gegenüber allen Sulfonamiden besteht (Kalkut, 1998).

Die bekannten Resistenzmechanismen für TMP sind eine erhöhte Undurchlässigkeit der Zellmembran, ein alternativer Metabolismus zum Folsäureweg (Amyes & Smith, 1975), Überproduktion der Dihydrofolsäurereduktase sowie Produktion einer resistenten Reduktase (Huovinen, 1987; Zinner & Mayer, 2015).

Die enzymatische Inaktivierung durch Hydrolyse oder Phosphorylierung ist bei Makroliden als Hauptresistenzmechanismus beschrieben. Daneben können Efflux-Pumpen die Makrolide direkt wieder aus der Zelle schleusen (Nakajima, 1999; Reis *et al.*, 2020). Ein weiterer Mechanismus ist die Methylierung der 23S rRNA durch Methyltransferase (Gaynor & Mankin, 2005).

3.4.3 Resistenzmechanismen im Biofilm

Zusätzlich zu den bisher genannten Resistenzmechanismen gehören weitere Biofilm-spezifische Mechanismen, die einen wichtigen Vorteil der Mikroorganismen vor antibiotisch wirksamen Molekülen darstellen (Hathroubi *et al.*, 2017; Stewart, 2015). Die substanzspezifische Toleranz gegenüber Antibiotika beruht unter anderem auf Diffusion oder Sorption der Wirkstoffe an der Biofilmmatrix oder auf Reaktionen mit Enzymen aus der EPS. Der Biofilm kann aber auch selbst als physische Barriere dienen, sodass die Wirkstoffe nicht zu den Biofilmzellen gelangen. Wenn die Wirkstoffe in den Biofilm diffundieren, können Biofilmzellen verschiedene Zellzustände einnehmen, um sich zu schützen. Zu den widerstandstarken Zuständen gehören Zellen mit langsamen Wachstumsraten (z.B. viable but nonculturable status, VNBC-Status) und persistierende Zellen (persister cells, Flemming *et al.*, 2016; Olsen, 2015). Die persistierenden Zellen sind dabei eine Subpopulation im Biofilm, die tolerant gegenüber antibiotischen Wirkstoffen sein kann, in dem sie sich in einen Ruhezustand versetzt.

Der Antibiotikaeinfluss auf den Biofilm ist nicht nur substanzabhängig, sondern auch von der Spezies, die mit dem Wirkstoff konfrontiert wird. Beispiele zeigen, dass Antibiotika das Biofilmwachstum hemmen konnten. Durch eine Konzentration von 1 % der minimalen Hemmkonzentration (MHK) vom Makrolid Azithromycin konnte die Bildung eines Biofilms aus *Pseudomonas (P.) aeruginosa* verhindert werden (Ichimiya *et al.*, 1996). Als Erklärung wurde die Störung des Quorum Sensing genannt sowie eine Störung der Produktion von Alginate, was eine wichtige EPS-Komponente darstellt (Kaplan, 2011). Auf der anderen Seite sind Antibiotika in der Lage die Biofilmbildung zu induzieren. Dafür sind bisher keine genauen Mechanismen bekannt und die Wirkung hängt ebenfalls von der Substanz sowie der Bakterienspezies ab (Ranieri *et al.*, 2018)

3.5 Stand der Biofilmforschung in Wasserleitungen und -aufbereitung

Rohrleitungen von Trink- und Tränkwassersystemen werden ubiquitär von Biofilmen besiedelt (Block, 1992; Flemming, 2006; Schulz *et al.*, 2014). Diese können sowohl von pathogenen als auch nicht pathogenen Mikroorganismen gebildet werden (Hemdan *et al.*, 2021). Ebenfalls können sich durch kontaminiertes Wasser pathogene Keime an schon in den Rohrleitungen vorhandene Biofilme anlagern und dort über einen langen Zeitraum überleben, was eine mögliche Gefahr für die menschlichen Gesundheit birgt (Wingender & Flemming, 2011). Da die Antibiotikaresistenzbildung der in Biofilmen lebenden Bakterien und die Übertragungsmöglichkeiten der Resistenzen allgemein diskutiert werden, werden im Speziellen diese Szenarien im Hinblick auf Risiken für den Menschen untersucht (Sanganyado & Gwenzi, 2019; Xi *et al.*, 2009). Ein prinzipieller Weg Biofilmen und Resistenzen entgegenzuwirken, besteht darin, die Biofilmbildung durch verschiedene Mechanismen zu verhindern (Chien *et al.*, 2020; Ghosh *et al.*, 2020; X. Li *et al.*, 2018; Mishra *et al.*, 2020; Paluch *et al.*, 2020; Reen *et al.*, 2018). Nach Flemming (2020) ist dies jedoch auf lange Sicht aussichtslos, da jede Oberfläche in einem offenen System früher oder später von Bakterien besiedelt wird und sich ein Biofilm darauf ausbildet (Flemming, 2020). Somit ist eine andere und zusätzliche Herangehensweise mit dem Problem „Biofilm“ umzugehen, die ausgebildeten Biofilme zu entfernen oder zumindest zu kontrollieren. Dies stellt jedoch eine Herausforderung dar, da Biofilme starke Toleranzfähigkeiten besitzen (Blackman *et al.*, 2021; Carrascosa *et al.*, 2021; Flemming, 2020; Plakunov *et al.*, 2017). Anfangs wurden Rohrleitungen, insbesondere durch Chlorung, desinfiziert (Characklis, 1973), wodurch sich jedoch schnell eine erhöhte Toleranz des Biofilms ausbildete (Schwering *et al.*, 2013).

Einen anderen Aspekt der Biofilmforschung in Wassersystemen stellt das Ausnutzen der Biofilmeigenschaften in der Abwasseraufbereitung, um Verunreinigungen aus dem Wasser zu entfernen, dar (Lazarova, 1995; Lewandowski & Boltz, 2011; Martin & Nerenberg, 2012). Dabei wurden unter anderem Bewegtbett-Biofilmreaktoren (moving bed biofilm reactor, MBBR) entwickelt (Ødegaard, 1999; Ødegaard *et al.*, 1994) mit stetigen Erweiterungen (Borkar *et al.*, 2013; di Biase *et al.*, 2019; Leyva-Díaz *et al.*, 2017). Zum Beispiel werden sie für die Aufreinigung des stark an Medikamenten kontaminierten Krankenhausabwassers untersucht (Escolà Casas *et al.*, 2015). Bei der Auswertung für die MBBR-Verwendung in der Wasseraufbereitung werden bisher die Veränderungen bzgl. der Konzentrationen von spezifischen Verunreinigungen betrachtet (Tang *et al.*, 2017). Es wurden dabei keine Mechanismen und Wechselwirkungen zwischen den Xenobiotika und den Biofilmen diskutiert, dies ändert sich in jüngster Zeit (Oberoi *et al.*, 2019; Senta *et al.*, 2019; L. Wang *et al.*, 2018; Zumstein & Helbling, 2019). Bis zum vollständigen Abbau einer Substanz durch Mineralisierung entstehen durch die EPS des Biofilms zunächst neue Transformationsprodukte, deren Auswirkungen auf die Umwelt und Umgebung größtenteils unbekannt sind (Ooi *et al.*, 2017).

In Trinkwasserleitungen wurden bisher bei der Untersuchung von Biofilmen und Xenobiotika nur geringe Konzentrationen, die aus unvollständiger vorheriger Aufbereitung noch im Wasser vorhanden sind, und deren Wechselwirkung mit dem Biofilm untersucht (H. Wang *et al.*, 2019). Die Wechselwirkungen zwischen Wirkstoffen, die bei der Medikation von Tieren über Tränkwasserleitungen verabreicht werden, mit den vorhandenen Biofilmen wurde bisher nicht untersucht. Der große Unterschied ist, dass es sich um vergleichsweise hohe Antibiotikakonzentrationen handelt, da diese in therapeutischen Dosen für die zu behandelnden Tiere angewendet werden.

3.6 Analysetechniken

In diesem Kapitel werden die Analysetechniken vorgestellt, die in dieser Arbeit Anwendung fanden. In der Analytik von Antibiotika in verschiedenen Matrices wird häufig die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography, HPLC) eingesetzt (Puckowski *et al.*, 2016). Abhängig von den zu detektierenden Substanzen und der Konzentration kann die HPLC mit UV-Detektor (UV), Fluoreszenz-Detektor (FLD) oder mit dem Massenspektrometer (MS) gekoppelt werden, wobei auf die Technik des Massenspektrometers im Folgenden eingegangen wird.

3.6.1 Massenspektrometrie

Ein Massenspektrometer (MS) bestimmt die Masse-zu-Ladungsverhältnisse (m/z) von Molekülen oder Fragmenten (Harris, 2014). Nach der HPLC-Auftrennung der Substanzen aus der Probe gelangen die Analyten zuerst in das Einlasssystem, daraufhin in die Ionenquelle, einen Massenanalysator und am Ende in einen Detektor.

Als Ionisierungsart wurde in dieser Arbeit die Elektrospray-Ionisation (electrospray ionization, ESI) als weiche Ionisationsmethode verwendet (Gey, 2021). Dabei werden die Analyten in der Probenflüssigkeit bzw. im Eluenten durch eine Kapillare gefördert, die am Ende bei Atmosphärendruck von einem elektrischen Feld umgeben ist (Gross, 2019). Dies führt zur elektrischen Aufladung der Substanzmoleküle. Durch die elektrostatischen Kräfte werden die Tröpfchen zur Gegenelektrode hin zu einem Kegel verformt. Dieser sogenannte Taylor-Konus bewirkt eine Spitze am Tröpfchen, das durch Überwinden der Oberflächenspannung am Rayleigh-Limit zu einem feinen geladenen Strahl wird (Fenn *et al.*, 1990). Dieser Strahl zerstäubt durch abstoßende Coulomb-Kräfte und die aerodynamische Beanspruchung zu einem elektrisch geladenen Aerosol. Mithilfe von heißem Stickstoffgegenstrom wird die Lösungsmittelverdampfung forciert. Dieses sogenannte Elektrospray besteht nach vollständigem Verdampfen des Lösungsmittels aus geladenen Quasimolekülen mit verschiedenen Ladungsträgern, z. B. in Form von $[M+H]^+$ oder $[M+\text{Alkalimetall}]^+$ im positiven Modus. Die Ionen gelangen durch ein

Interface in einen Massenanalysator, wonach sie vom Detektor als Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) aufgezeichnet werden (Gross, 2013).

In dieser Arbeit wird ein QTRAP®-System verwendet, das aus drei hintereinandergeschalteten Quadrupolen als Massenanalysatoren besteht. Bei einem linearen Quadrupol benötigt man vier konzentrisch angeordnete Metallstäbe, von denen je zwei mit positivem und zwei mit negativem Gleichspannungspotential belegt sind (Gey, 2021). Die Gleichspannung wird von einer hochfrequenten Wechselfspannung überlagert, sodass sich ein ausgewähltes m/z -Verhältnis in der Mitte der vier Stäbe bewegt. Durch die Einstellung der angelegten Spannung und Frequenz werden ausgewählte m/z -Verhältnisse zum Detektor gelenkt. Durch die Kombination zweier Massenanalysatoren hintereinander (MS/MS, auch Tandem-Massenspektrometrie genannt) können im ersten Quadrupol (Q1) nach m/z -Verhältnissen selektiert werden, die in der darauffolgenden Kollisionszelle (Q2) durch ein Kollisionsgas (z. B. Stickstoff, Argon) fragmentiert werden. Die Produktionen werden im hinteren Quadrupol (Q3) selektiert und anschließend detektiert (Gross, 2019). Werden im Q1 und im Q3 jeweils ein festes m/z -Verhältnis ausgewählt, spricht man vom sogenannten Single Reaction Monitoring (SRM). Werden für das gleiche Vorläuferion mehrere m/z -Verhältnisse im Q3 selektiert, handelt es sich um Multiple Reaction Monitoring (MRM).

Das QTRAP®-System bietet die zusätzliche Möglichkeit, den hinteren Quadrupol (Q3) als Ionenfalle zu schalten (AB Sciex™, 2018a). Hierbei können Ionen akkumuliert bzw. gesammelt werden, um dann einen Massenscan durchzuführen. Vorteile sind eine schnelle Datenaufnahme und eine höhere Intensität der Fragmentationen im Vergleich zum MRM-Modus (AB Sciex™, 2018a). Darüber hinaus kann eine weitere Fragmentierung der Zielanalyten vorgenommen werden (MS³).

Die hochauflösende Massenspektrometrie (high resolution MS, HR-MS) wird unter anderem zur Bestimmung der exakten Masse von Molekülen verwendet, was zur Generierung von Summenformeln verwendet wird und somit ein wichtiger Bestandteil im Methodenverbund zur Strukturaufklärung von Substanzen ist (Gross, 2019). In dieser Arbeit wurde dafür das TripleTOF-MS® 5600+ von AB Sciex verwendet. Dieses besteht aus einem Quadrupol als erstem Massenanalysator (Q1) und einer Kollisionszelle (AB Sciex™, 2018b). Darauf folgt ein Flugzeitanalysator (time-of-flight, TOF) als weiterer Massenanalysator (Abbildung 3.7).

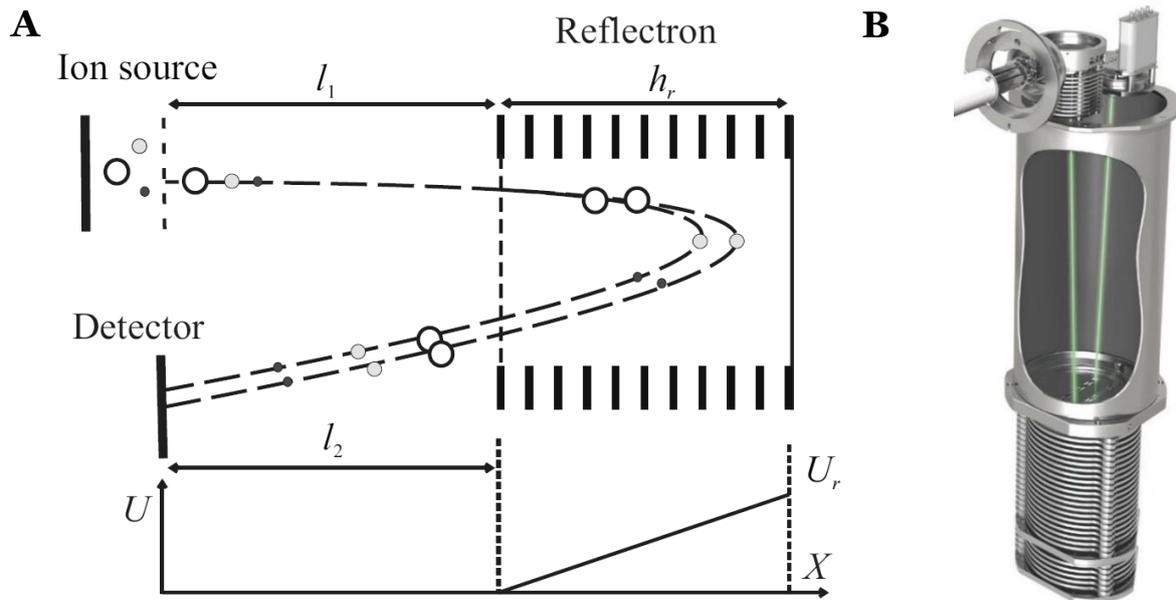


Abbildung 3.7: **A)** schematische Darstellung des TOF mit Reflektrom und darunter der zugehörige Spannungsverlauf (entnommen aus Radionova *et al.*, 2016); **B)** Darstellung des TOF des TripleTOF® 5600+ von AB Sciex (entnommen aus AB Sciex™, 2020).

Das Prinzip eines TOF besteht aus der Ausnutzung der unterschiedlichen Flugzeiten von verschieden schweren Ionen (Gey, 2021). Dafür werden Ionen in einem elektrischen Feld beschleunigt und durchlaufen dann eine definierte feldfreie Flugstrecke, bei der am Ende die leichten Ionen schneller am Detektor ankommen als die schweren. Durch die Verwendung eines Ionenspiegels (Reflektrom, Abbildung 3.7) werden die Ionen an einem oder mehreren Punkten der Flugstrecke abgebremst und in Gegenrichtung wieder beschleunigt. Hierdurch kann eine längere Flugstrecke genutzt werden, ohne dass die Gerätedimensionen in gleicher Weise ansteigen (Boesl, 2017). Bei der Beschleunigung der Ionen nehmen die Ionen eines m/z -Verhältnisses theoretisch die gleiche kinetische Energie auf. In der Praxis gibt es geringfügige Unterschiede (Normalverteilung), was zu einer Verbreiterung des m/z -Signals und damit zu einer geringeren Auflösung führt. Das Reflektrom dient der Energiekorrektur von Ionen mit gleichen m/z -Verhältnissen aber unterschiedlichen kinetischen Energien (Abbildung 3.7), sodass sich die Energieverteilung verringert und die Auflösung erhöht wird (Radionova *et al.*, 2016). Das TOF des TripleTOF® von AB Sciex (Name: Accelerator TOF Analyzer) verwendet einen 2-Stufen-Spiegel für eine hohe Auflösung und Raumeffizienz (AB Sciex™, 2020). Durch den zweiten Spiegel kann eine kompakte Bauweise erreicht sowie die Fokusslänge durch Spannungseinstellungen verändert werden (Cornish & Cotter, 1993).

3.6.2 Bildgebende MALDI-Massenspektrometrie (MALDI-MSI)

Bei der bildgebenden Massenspektrometrie (mass spectrometry imaging, MSI) werden oberflächennahe Moleküle von Proben in Abhängigkeit vom m/z -Verhältnis visualisiert (Gross,

2013). Die Bildgebung erfolgt orts aufgelöst in zwei-dimensionalen Koordinaten. Durch diese Technik kann die Verteilung und das Konzentrationsprofil von Molekülen auf Oberflächenschichten sichtbar gemacht werden (Hillenkamp & Peter-Katalinic, 2013). MSI findet in der Umwelt- (Malooof *et al.*, 2020) und Bioanalytik (Mokosch *et al.*, 2021; Righetti *et al.*, 2021; Susniak *et al.*, 2020) sowie der Medizin (Ucal *et al.*, 2017) zum Beispiel zur Zellanalytik von Gewebeschichten Anwendung. Aber auch für die Visualisierung von Biofilmen wurde MSI eingesetzt (Lanni *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2018).

Für die MSI müssen die Moleküle von der Oberfläche desorbiert und ionisiert werden, wobei sich die Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation (matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI) etabliert hat (Gross, 2013). Dafür wird auf die Probe ein dünner gleichmäßiger Film einer geeigneten Matrixkristallisationslösung gesprüht, die die Wellenlänge des Lasers effizient absorbieren kann (Juhasz *et al.*, 1993). Als Matrixlösung werden unter anderem Nikotinsäure, α -Cyano-4-hydroxycimtsäure und insbesondere 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) verwendet (Gross, 2013). Nach dem Einsetzen in den Probenhalter wird ein Laserpuls auf die Probe mit Matrix gerichtet (Abbildung 3.8 a und b1). Dabei verdampft und ionisiert die Matrix, dehnt sich aus und trägt den Analyten aus der Probe Richtung Massenanalysator. Während dieses Prozesses wird die Ladung der Matrixmoleküle auf den Analyten übertragen (Abbildung 3.8 b2 und b3).

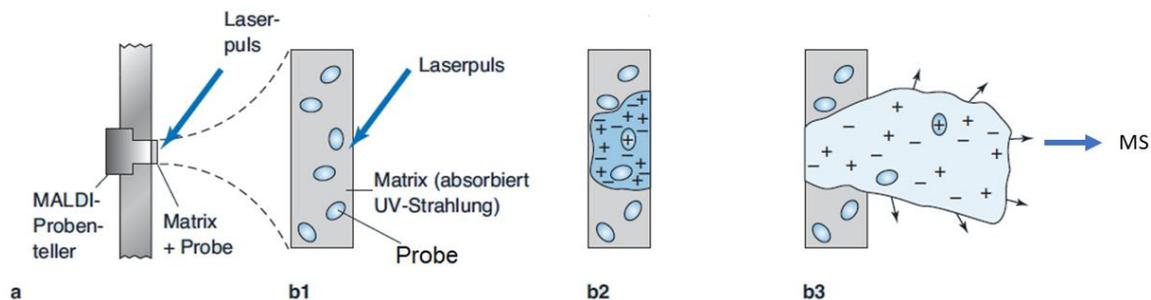


Abbildung 3.8: Darstellung der MALDI-Technik: a) Probenhalter mit Matrixkristallisationslösung und Probe; b1) Vergrößerung von a) Laserpuls trifft Matrix mit Probe, b2) Matrix wird durch Laserpuls ionisiert und verdampft. Analyt aus der Probe erhält Ladung; b3) Dampf expandiert und es entsteht eine Wolke (bearbeitet aus Harris, 2014).

In dieser Arbeit wurde eine AP-SMALDI-Ionenquelle verwendet, bei der die Ionisierung unter Atmosphärendruck (atmospheric pressure, AP) und das Mapping mit einer Raster-Mikrosonden-MALDI-Technik (scanning microprobe MALDI, SMALDI) erfolgt (Spengler & Hubert, 2002). Ein Vorteil der Messung bei Atmosphärendruck ist die geringere Fragmentierung der Analyten im Vergleich zur Vakuum-MALDI (Doroshenko *et al.*, 2002).

Die durch die AP-SMALDI entstandenen Analytionen gelangen durch ein Objektiv mit einer Öffnung in eine Kapillare und werden in den Massenanalysator geleitet (Hillenkamp & Peter-Katalinic, 2013). Durch den Massenanalysator und darauffolgenden Detektor können die Analytionen nach ihren m/z -Verhältnissen detektiert und die Daten ausgewertet werden. Jede

MSI-Datei setzt sich aus einer großen Anzahl von Massenspektren zusammen, wobei jeder Rasterpunkt oder Pixel einem MALDI-Spektrum entspricht (Abbildung 3.9).

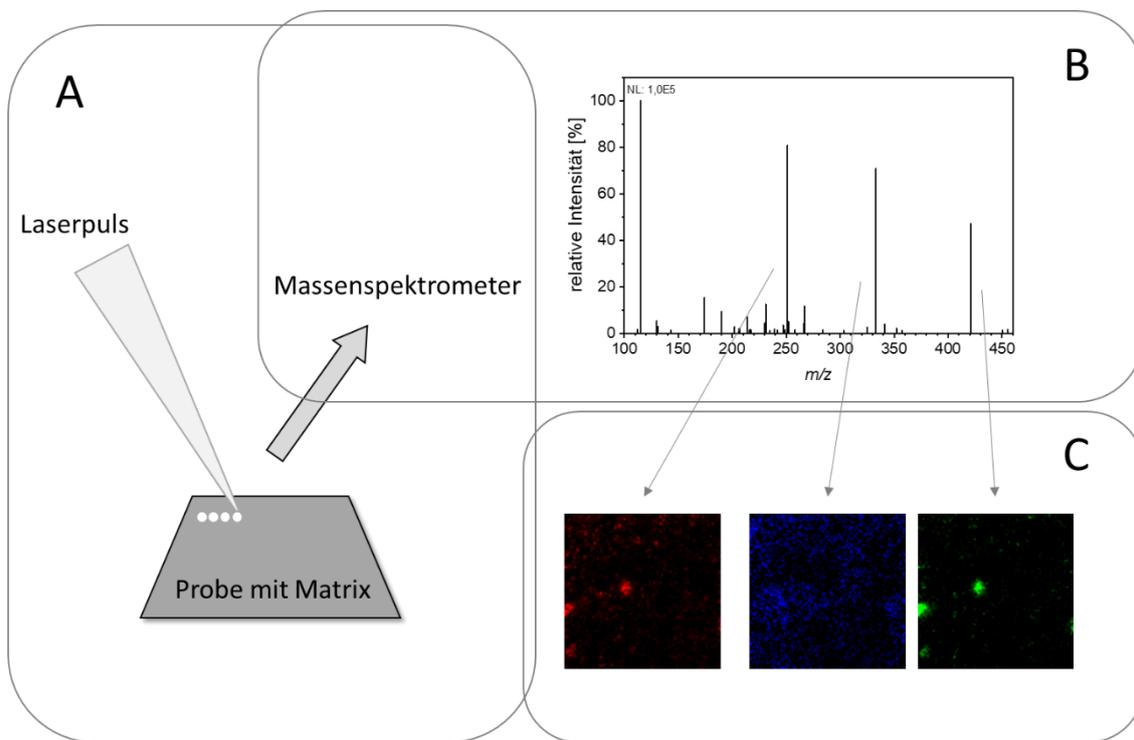


Abbildung 3.9: Schema des MSI-Prozesses: **A)** Die mit Matrix besprühte Probe wird mit dem Laserstrahl an den einzelnen Rasterpunkten beschossen; **B)** Von jedem Punkt wird ein Massenspektrum aufgenommen; **C)** Massenspektren werden anhand der Software den Rasterpunkten bzw. der Position auf der Probe zugeordnet. Die Intensität der Signale bestimmter m/z -Verhältnisse wird farbkodiert; in Anlehnung an (Römpp & Spengler, 2013).

Mittels der Software Mirion, die von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Spengler an der Justus-Liebig-Universität Gießen entwickelt wurde, können anhand der Massenspektren und der Intensität der Signale für ausgewählte m/z -Verhältnisse Bilder in der RGB-Darstellung (Rot-Grün-Blau) generiert werden (Abbildung 3.9 C, Paschke *et al.*, 2013). Beim Übereinanderlegen von zwei unterschiedlich gefärbten m/z -Bildern können mit der RGB-Darstellung durch farbliche Kennzeichnung Orte hervorgehoben werden, an denen beide m/z -Verhältnisse co-lokalisiert sind. Falls in einem Pixel sowohl ein in Rot dargestelltes m/z -Verhältnis als auch ein in Grün dargestelltes m/z -Verhältnis detektiert wurden, werden diese Pixel ins gelbliche gefärbt. Einfluss auf die Färbung hat die jeweilige gemessene Intensität des m/z -Verhältnisses. Diese Art der Darstellung erlaubt es, molekulare Überschneidungen einfach und schnell zu erkennen.

3.7 Zielstellung

In Tränkwasserleitungen sind mikrobielle Biofilme weit verbreitet, die einen Einfluss auf die Resistenzentstehung und -verbreitung gegenüber Antibiotika haben können. Da Antibiotika in der Tierhaltung auch über Tränkwasserleitungen verabreicht werden, sollte in dieser Arbeit der gegenseitige Einfluss von Biofilmen und Veterinärantibiotika untersucht werden. In Kooperation mit dem DBU-Projektpartner sollten reproduzierbare Modellbiofilme entwickelt, die Resistenzentwicklung untersucht und deren Interaktionen mit Antibiotika aufgeklärt werden. Für die Analyse mussten geeignete HPLC-UV-Methoden für die Veterinärantibiotika TYL A und dem Kombinationspräparat SDZ mit TMP entwickelt und validiert werden. Weiterhin sollte mittels MALDI-MSI erstmalig für ein Modell, das Biofilme in Tränkwasserleitungen nachahmt und mit handelsüblichen Konzentrationen an Antibiotika konfrontiert wird, die Verteilung der Antibiotika in diesem Biofilm untersucht werden. Dabei lag der Fokus auf einer schnellen Methode mit einfacher Handhabung ohne Aufarbeitung und Derivatisierung. Zusätzlich sollten Untersuchungen von SDZ und TMP in verschiedenen wässrigen Lösungen durchgeführt werden, die einen möglichen Einfluss spezieller Inhaltsstoffe auf die Stabilität der Wirkstoffe im Rahmen der Applikation erlauben. Mögliche Transformationsprodukte der Antibiotika, gebildet durch Stoffwechselreaktionen im Biofilm oder durch (a)biotische Reaktionen in verschiedenen Lösungen, sollten identifiziert, isoliert und charakterisiert werden.

Im DBU-Projektverbund sollten Arzneimittelformulierungen mit den Kombinationswirkstoffen SDZ und TMP hergestellt werden. Dabei wurde als Formulierungshilfsstoff Lactose verwendet. Da Lactose ein reduzierender Zucker ist, sollte in dieser Arbeit überprüft werden, in wie weit der Formulierungsstoff geeignet ist, gemeinsam mit SDZ und TMP verwendet zu werden. Dafür musste ein Konzept entwickelt werden, das die Stabilität der Wirkstoffe unter den Bedingungen der Arzneimittelherstellung überprüft.

4 Ergebnisse, Diskussion und Ausblick

4.1 Stabilitätsuntersuchungen von Sulfadiazin und Trimethoprim in wässrigen Lösungen

4.1.1 Methodvalidierung

Für die Quantifizierung von Sulfadiazin (SDZ) und Trimethoprim (TMP) in wässrigen Lösungen wurde eine RP-HPLC-UV-Methode entwickelt und validiert. Ziel war neben der chromatographischen Trennung der beiden Analyten auch potenzielle Transformationsprodukte basisliniengetreunt zu detektieren. Für die Validierung wurden die Parameter Nachweis- und Bestimmungsgrenze (NWG und BG), Inter- und Intraday-Präzision sowie Linearität bestimmt (Kromidas, 2011). NWG und BG wurden mittels der Kalibriergeradenmethode gemäß DIN 32645 ermittelt (Tabelle 4.1, Details siehe Kapitel 5.3.2). Die Interday-Präzision wurde über einen Messzeitraum von 2 Jahren für zwei Konzentrationspunkte pro Analyten ermittelt (Tabelle 4.2).

Tabelle 4.1: Validierungsparameter von SDZ und TMP.

Parameter	SDZ	TMP
Nachweisgrenze [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	0,031	0,004
Bestimmungsgrenze [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	0,107	0,014
Linearitätsbereich [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	1 – 200	10 – 100
Intraday-Präzision (RSD [%], n = 8)	0,22 (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	0,22 (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

Tabelle 4.2: Interday-Präzision von SDZ und TMP.

Interday-Präzision	Anzahl Messungen	Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	RSD [%]
SDZ	19	150	3,45
	25	100	3,39
TMP	21	100	4,08
	18	30	5,43

In der Literatur beschriebene HPLC-UV-Methoden zur simultanen Detektion von SDZ und TMP zeigen vergleichbare Kenndaten. Bei der Methode von Kumari und Kollegen, die in ähnlichen Konzentrationsbereichen arbeiteten, wurden höhere NWG (SDZ: 0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, TMP: 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

und BG (SDZ: 3,5 µg/mL, TMP: 1,0 µg/mL) bestimmt sowie eine höhere Intraday-Präzision (SDZ: 1,68 %; TMP: 1,31 %) (Kumari *et al.*, 2014). Die hier ermittelten NWG und BG wurden als ausreichend für die Zielanalytik erachtet. In Bezug auf die Intraday-Präzision wird für die Chromatographie ein Wert unter 1 % als zufriedenstellend eingestuft (Kromidas, 2011), was für die hier ermittelten Intraday-Präzisionen von SDZ und TMP klar erfüllt wird.

Demnach kann die entwickelte HPLC-UV-Methode als geeignet und präzise bewertet werden.

4.1.2 Stabilitätsuntersuchungen

Die Stabilität von SDZ und TMP wurde in verschiedenen Lösungen untersucht, um Einflüsse von verschiedenen Ionen und Puffersystemen sowie von Extraktions- und Verabreichungslösungen auf die Wirkstoffe abschätzen zu können. Dafür wurden die beiden Analyten in einem Verhältnis von 3:2 (SDZ:TMP) in den in Tabelle 4.3 aufgeführten Lösungen angesetzt (Hahne *et al.*, 2023). Dabei sollten Einkomponenten-Lösungen bei verschiedenen pH-Werten verwendet werden, die unter anderem zur Extraktion, als Eluenten oder Lagerlösungsmittel (Balakrishnan *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2016), als Lösung zur Stabilitätsuntersuchung (OECD, 2004) eingesetzt werden oder in natürlichen Wässern vorliegen (Kamphues *et al.*, 2007).

Tabelle 4.3: Lösungen zur Untersuchung der Stabilität von SDZ und TMP.

Parameter	Spezifikation
Sauer	0,1 %-ige Ameisensäurelösung pH 2,8
	0,1 M Phosphatpuffer-Lösung pH 3
	0,1 M Ammoniumacetatlösung pH 5
	Reinstwasser pH 6,2*
Basisch	0,1 M Phosphatpuffer-Lösung pH 8
Sonstiges	Eisenlösung mit 2 und 10 mg/L Eisen(III)-Ionen

* pH-Wertmessung für Reinstwasser erfolgte am Ende des Versuches.

4.1.2.1 Stabilität in Lösungen mit unterschiedlichen pH-Werten

Matrixfreie, wässrige Lösungen von SDZ (120 µg/mL) und TMP (80 µg/mL) wurden über einen Untersuchungszeitraum von 15 Monaten bei Raumtemperatur mit und ohne Lichteinfluss gelagert. In dem Leitfaden zur Chemikaliensicherheit der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (Organization for Economic Co-operation and Development, OECD) werden Substanzen anhand ihrer Stabilität von 5 Tagen bei 50 °C in verschiedenen Lösungen auf ihre Halbwertszeit von über einem Jahr abgeschätzt (OECD, 2004). Dies sollte durch

den gewählten Zeitraum von 15 Monaten überprüft werden. Die Konzentrationen von SDZ (Tabelle 4.4) und TMP (Tabelle 4.5) wurden nach dem Ansetzen der Lösungen (t = 0 Monate) sowie nach 4 und 15 Monaten ermittelt.

Tabelle 4.4: SDZ-Konzentrationen in verschiedenen wässrigen Lösungen unter und ohne Lichteinfluss über einen Untersuchungszeitraum von 15 Monaten.

Lösung	Lichteinfluss	SDZ-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]			Gehaltsänderung [%]
		Zeitraum [Monate]			
		0	4	15	
Ameisensäurelösung pH 2,8	uL	122,0	115,8	114,0	- 6,6 *
	oL	124,9	125,1	124,0	- 0,8
Phosphatpuffer pH 3	uL	126,7	124,8	121,1	- 4,4 *
	oL	126,0	130,3	128,2	1,8
Acetatpuffer pH 5	uL	123,5	121,8	118,5	- 4,0 *
	oL	128,2	128,8	126,9	- 1,0
Reinstwasser pH 6,2	uL	121,7	118,4	115,3	- 5,2 *
	oL	119,9	121,9	120,7	0,7
Phosphatpuffer pH 8	uL	122,0	115,1	112,8	- 7,5

Erklärungen: **uL**: Probenlagerung unter Lichteinfluss; **oL**: Probenlagerung ohne Lichteinfluss; Gehaltsänderung ist prozentuale Konzentrationsänderung des letzten Messpunktes im Vergleich zur Anfangskonzentration (ca. 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

* Statistik: *t*-Test zwischen ohne und unter Lichteinfluss: $p < 0,001$.

SDZ zeigt in allen Lösungen ohne Lichteinfluss eine höhere Stabilität als in den Lösungen mit Lichteinfluss im Messzeitraum von 15 Monaten. Ohne den Einfluss von Licht liegen die SDZ-Konzentrationsveränderung zwischen - 1,0 bis + 1,8 %. Die Erhöhung der Konzentration kann durch die Messunsicherheit erklärt werden. Bei Lagerung ohne Lichteinfluss hatte die Zusammensetzung der wässrigen Lösung keinen Einfluss auf die SDZ-Konzentration. Mit Lichteinfluss waren höhere Konzentrationsverluste - 7,5 bis - 4,0 % zu verzeichnen, wobei der höchste Rückgang in der phosphatgepufferten Lösung bei einem pH-Wert von 8 nachgewiesen wurde, wie tendenziell in Hahne *et al.* (2023) gezeigt werden konnte.

Entsprechend dem Leitfaden der OECD wurde gezeigt, dass SDZ in vorgeschriebenen Pufferlösungen bei den pH-Werten von 4, 7 und 9 hydrolysestabil ist (Białk-Bielińska *et al.*, 2012; Biošić *et al.*, 2017). Nach OECD (2004) gilt eine Substanz als hydrolysestabil, wenn sich diese nach

5 Tagen bei 50 °C ohne Licht- und Sauerstoffeinfluss um weniger als 10 % abbaut. Daraus wird eine Halbwertszeit von über einem Jahr bei 25 °C geschlussfolgert. Die Stabilität von SDZ in den hier untersuchten Lösungen konnte bestätigt werden.

Eine pH-Abhängigkeit der Stabilität von SDZ unter Lichteinfluss konnte in anderen Studien nachgewiesen werden (Conde-Cid *et al.*, 2018; Periša *et al.*, 2013). Bei einem pH-Wert von 8 liegt SDZ in anionischer Form vor, die schneller unter Lichteinfluss abgebaut wird. Dabei konnte kein Einfluss von Natriumchlorid, Natriumnitrat oder Natriumhydrogenphosphat auf eine Konzentrationsreduzierung nachgewiesen werden (Conde-Cid *et al.*, 2018). Bei einem pH-Wert von 5 liegt SDZ in der ungeladenen Form vor und hatte unter den Bedingungen in dem hier durchgeführten Versuch den geringsten Verlust zu verzeichnen. Je niedriger der pH-Wert der Lösung ist, desto mehr überwiegt die kationische Form von SDZ und die Hydrolyserate nimmt erneut zu (Białk-Bielińska *et al.*, 2012; Manzo & de Bertorello, 1978). Dies konnte in diesen Untersuchungen bestätigt werden, die im Vergleich zu dem OECD-Leitfaden auch unterhalb eines pH-Wertes von 4 durchgeführt wurden.

Tabelle 4.5: TMP-Konzentrationen in verschiedenen wässrigen Lösungen unter und ohne Lichteinfluss über einen Untersuchungszeitraum von 15 Monaten.

Lösung	Licht- einfluss	TMP-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]			Gehalts- änderung [%]*
		Zeitraum [Monate]			
		0	4	15	
Ameisensäurelösung pH 2,8	uL	79,3	78,3	78,3	- 1,3
	oL	80,0	77,3	78,2	- 2,2
Phosphatpuffer pH 3	uL	83,3	78,1	79,5	- 4,5
	oL	81,2	78,2	78,9	- 2,8
Acetatpuffer pH 5	uL	80,1	75,9	76,4	- 4,7
	oL	85,7	79,7	80,4	- 6,1
Reinstwasser pH 6,2	uL	79,3	79,5	79,2	- 0,1
	oL	80,6	78,4	78,4	- 2,8
Phosphatpuffer pH 8	uL	81,6	75,1	74,6	- 8,6

Erklärungen: **uL**: Probenlagerung unter Lichteinfluss; **oL**: Probenlagerung ohne Lichteinfluss; Gehaltsänderung ist prozentuale Konzentrationsänderung des letzten Messpunktes im Vergleich zur Anfangskonzentration (ca. 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

* Statistik: *t*-Test zwischen ohne und unter Lichteinfluss: $p = 0,3$.

Bei TMP konnte ohne Lichteinfluss eine Konzentrationsveränderung von - 6,1 bis - 2,2 % nach 15 Monaten nachgewiesen werden. Unter Lichteinfluss schwankte die Gehaltsänderung von -8,6 bis -0,1 %. Im Gegensatz zu SDZ kann bei TMP keine höhere Stabilität ohne Lichteinfluss nachgewiesen werden. Bei diesem Wirkstoff scheint der Einfluss des Lösungsmittels auf die Instabilität größer zu sein. In Reinstwasser und in der Ameisensäurelösung wurden die geringsten Konzentrationsverluste detektiert. TMP hatte wie SDZ in der Phosphatpufferlösung mit einem pH-Wert von 8 den höchsten Konzentrationsverlust von 8,6 %.

Auch für TMP konnte nach dem OECD-Leitfaden gezeigt werden, dass sich die Verbindung im Dunkeln innerhalb von 5 Tagen bei 50 °C weniger als 1 % abbaute (Biošić & Babić, 2020; OECD, 2004). Demnach gilt TMP als hydrolysestabil. In Phosphatpufferlösungen bei unterschiedlichen pH-Werten von 2 bis 11 und Temperaturen von 7, 22 und 35 °C über 3 Wochen ergaben sich für TMP ebenfalls hohe Stabilitätswerte (Loftin *et al.*, 2008). Im Gegensatz zu den hier durchgeführten Untersuchungen konnte in der Studie von Loftin *et al.* (2008) keine Reduzierung von TMP ermittelt werden, wobei die TMP-Proben über 3 Wochen im Dunkeln in 0,004 M Phosphatpufferlösungen gelagert wurden. Die Phosphat-Konzentration war 25fach geringer als in den hier untersuchten Proben. Daraus lässt sich ein Einfluss durch die hier verwendeten Ionenkonzentrationen und der vergleichweisen langen Versuchsdauer auf die leicht geringere TMP-Stabilität erklären. Eine Abhängigkeit von Salzkonzentrationen konnte durch Sirtori *et al.* (2010) ebenfalls ermittelt werden. Im Kontrast zu SDZ ist in der Literatur keine deutliche pH-Abhängigkeit der TMP-Stabilität unter Lichteinfluss beschrieben (Biošić & Babić, 2020; Luo *et al.*, 2012). Auch dies steht im Einklang mit den eigenen Untersuchungen. Hier konnte erstmals über einen langen Zeitraum von 15 Monaten gezeigt werden, dass TMP mit und ohne Lichteinfluss in verschiedenen wässrigen Lösungen bei den hier untersuchten pH-Werten stabil ist.

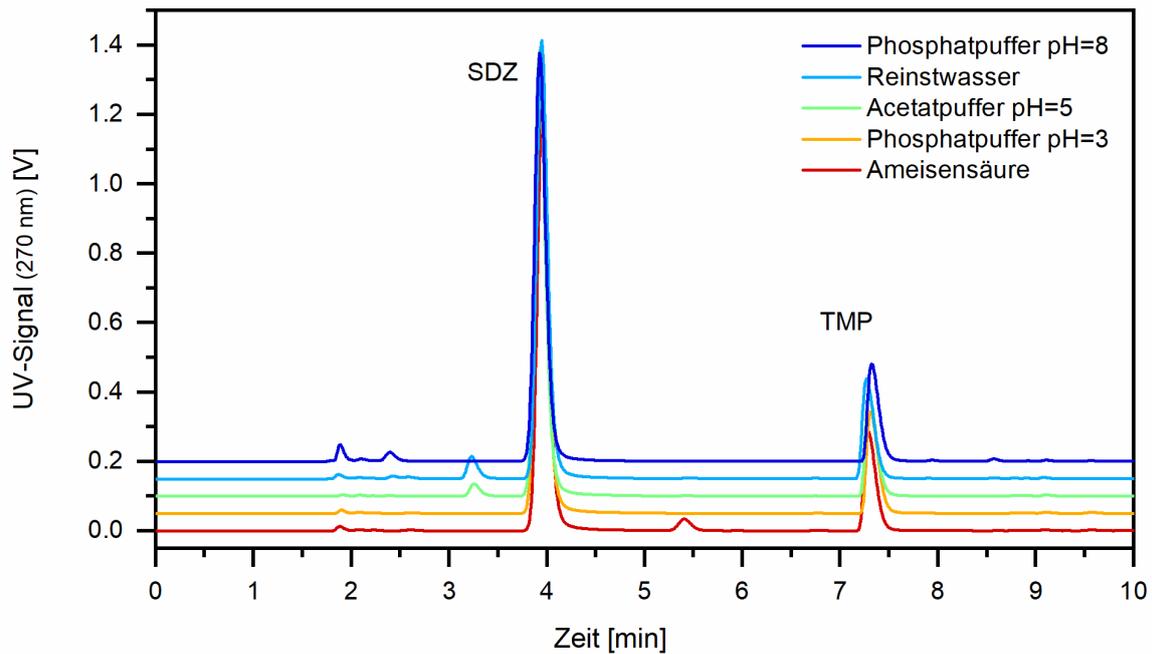


Abbildung 4.1: UV-Chromatogrammausschnitte von SDZ und TMP in verschiedenen Lösungen unter Lichteinfluss nach 15 Monaten.

In den UV-Chromatogrammen der Proben mit Lichteinfluss nach 15 Monaten (Abbildung 4.1) stellen die Signale von SDZ und TMP die Hauptpeaks dar. In den verschiedenen Lösungen sind nur einige kleine Peaks zu erkennen, die Transformationsprodukte der Wirkstoffe darstellen könnten. In Abhängigkeit von der Lösung wurden unterschiedliche Peaks detektiert, wobei nach 15 Monaten in Reinstwasser der größte Peak mit einem prozentualen Gehalt von maximal 5,5 % nachgewiesen wurde (Peakfläche bezogen auf Peakfläche des SDZ-Standards von 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ unter Annahme gleicher Extinktionskoeffizienten). Alle anderen Peaks der Transformationsprodukte hatten einen relativen Anteil unter 4 %.

Die Ergebnisse zeigen, dass die verwendeten Lösungen für eine Lagerung von SDZ und TMP ohne Lichteinfluss geeignet sind. Da die Wirkstoffe eine hohe Stabilität über den Zeitraum von 15 Monaten zeigten sowie die Anteile der potenziell gebildeten Transformationsprodukte gering waren, wurden keine weiteren Untersuchungen bezüglich der Identifizierung der Produkte unternommen. Nach OECD (2004) wird eine Identifizierung erst ab einem relativen Produktanteil von 10 % empfohlen.

4.1.2.2 Stabilität in Eisenlösungen

In der Praxis werden die Medikamente im landwirtschaftlichen Betrieb zum Teil im betriebs-eigenen Brunnenwasser gelöst (Meißner, 2016). Brunnenwässer können Eisengehalte von bis zu 31,9 mg/L aufweisen (Kamphues *et al.*, 2007) und somit durch Redoxreaktionen oder Ausfällung einen Einfluss auf die Wirksamkeit der Arzneimittel entfalten. Aus diesem Grund wurde die Lagerstabilität von SDZ und TMP in Eisen(III)-Lösungen untersucht. Hierfür wurden die Analyten

in Eisen(III)-Lösungen mit 2 mg/L und 10 mg/L angesetzt, bei Raumtemperatur unter Lichteinfluss oder im Kühlschrank gelagert und über einen Zeitraum von 50 Tagen untersucht.

Tabelle 4.6: SDZ-Konzentrationen in Lösungen mit verschiedenen Eisen-Gehalten unter Lichteinfluss bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank über einen Versuchszeitraum von 50 Tagen.

Eisengehalt	SDZ-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]			
	2 mg/L		10 mg/L	
Tag	uL	K	uL	K
0	118,6	115,7	117,1	118,0
2	115,9	115,7	115,7	116,1
9	114,9	115,2	115,0	116,1
26	111,1	114,1	109,1	114,7
50	106,8	113,5	105,4	114,1
Gehaltsänderung [%]	- 9,9 *	- 1,9	- 10,0 *	- 3,4

Erklärungen: **uL**: Probenlagerung unter Lichteinfluss bei Raumtemperatur (21 °C); **K**: Probenlagerung im Kühlschrank (4 °C) ohne Lichteinfluss; Gehaltsänderung ist prozentuale Konzentrationsänderung des letzten Messpunktes im Vergleich zur Anfangskonzentration (ca. 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

* *t*-Test zwischen uL und K: $p < 0,005$.

Bei 4 °C zeigte SDZ nach 26 und 50 Tagen eine höhere Stabilität als bei Raumtemperatur (Tabelle 4.6). Im Kühlschrank reduzierte sich die SDZ-Konzentration bei einem Eisengehalt von 2 bzw. 10 mg/L um 1,9 % bzw. 3,4 %. Im Kontrast dazu zeigten die Proben mit Lichteinfluss keinen Einfluss der Eisenkonzentration auf die SDZ-Konzentrationsreduzierung. In beiden Lösungen wurden nach 50 Tagen 10 % weniger im Vergleich zum Ansetztag bestimmt. Allerdings könnte die Differenz der verwendeten Eisenkonzentrationen in diesem Versuchsaufbau zu gering sein, um einen Einfluss auf die Stabilität von SDZ nachzuweisen.

Während des Versuchszeitraums wäre die Bildung eines Eisen(III)-Sulfadiazin-Komplexes möglich, wodurch sich die Konzentration des freien SDZ verringert (Tella & Obaleye, 2010) und mittels HPLC nicht bestimmbar wäre. Das Ziel der Studie von Tella und Obaleye (2010) war die Bestimmung der Stabilitätskonstante des Komplexes, sodass kein Vergleich bezüglich der Lagerung oder der Einfluss der Eisenkonzentration zu den hier ermittelten Ergebnissen gezogen werden kann. In dem hier durchgeführten Versuch konnte nach 2 Tagen eine Reduktion von 2,3 %

bzw. 1,2 % bei einem Eisengehalt von 2 bzw. 10 mg/L bestimmt werden. Eine andere Studie konnte schon nach einer Stunde eine SDZ-Reduktion von 3,1 % nachweisen (Acosta-Rangel *et al.*, 2019). Dabei wurde eine 0,02 M Eisen(III)-Lösung verwendet. Nachforschungen zum Verbleib von SDZ und anderen Sulfonamiden wurden nicht unternommen. Da die Eisenkonzentration bei Acosta-Rangel *et al.* um ein Vielfaches höher als in diesem Versuchsaufbau war und eine höhere Reduktion in kürzerer Zeit erreicht wurde, kann ein Einfluss von hohen Eisen(III)-Konzentrationen nicht ausgeschlossen werden.

Tabelle 4.7: TMP-Konzentrationen in Lösungen mit verschiedenen Eisen-Gehalten unter Lichteinfluss bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank über einen Versuchszeitraum von 50 Tagen.

TMP-Konzentration [$\mu\text{g/mL}$]				
Eisen-Gehalt	2 mg/L		10 mg/L	
Tag	uL	K	uL	K
0	77,3	76,1	76,0	76,6
2	75,8	75,9	75,9	76,2
9	75,7	75,8	75,4	76,3
26	75,1	75,7	70,5	76,1
50	74,0	75,7	66,6	75,9
Gehaltsveränderung [%]	-4,3 *	-0,5	-12,4 *	-1,0

Erklärungen: **uL**: Probenlagerung unter Lichteinfluss bei Raumtemperatur (21 °C); **K**: Probenlagerung im Kühlschrank (4 °C) ohne Lichteinfluss; Gehaltsänderung ist prozentuale Konzentrationsänderung des letzten Messpunktes im Vergleich zur Anfangskonzentration (ca. 80 $\mu\text{g/mL}$).

* ANOVA zwischen uL und K: $p < 0,05$.

Bei TMP ist im Vergleich zu SDZ ein Einfluss des Eisengehaltes unter Lichteinfluss zu erkennen (Tabelle 4.7). In der Lösung mit 10 mg/L wurde eine Reduktion des Gehaltes um 12 % detektiert, wohin bei der 2 mg/L Eisenlösung ein um 4,3 % geringerer Gehalt nachgewiesen werden konnte. In diesem Fall hat die fünffache Konzentration an Eisen eine dreifache Reduktion der TMP-Konzentration zu Folge. Die gekühlten Proben unterschieden sich signifikant von den unter Lichteinfluss gelagerten Proben. Dabei konnte diese eine Differenz von bis zu 1 % aufweisen, sodass TMP unter diesen Bedingungen als relativ stabil über einen Zeitraum von 50 Tagen angesehen werden kann. Auch für TMP ist die Bildung eines Eisen(III)-Komplex beschrieben, der

bei den hier durchgeführten Untersuchungen zur Verringerung der Gehalte geführt haben könnte (Dias *et al.*, 2014; Tella & Obaleye, 2010).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Eisenlösungen bei längerer Lagerung einen Einfluss auf die Stabilität von SDZ und TMP haben können. Eine kurzzeitige Lagerung von zwei Tagen unter kühlen Bedingungen und ohne Lichteinfluss hat jedoch nur einen geringen Einfluss auf die Gehalte von SDZ und TMP. Daher kann davon ausgegangen werden, dass das Ansetzen von Lösungen mit SDZ und TMP im Brunnenwasser nur einen geringen Einfluss auf die Wirkstoffe hat. Dennoch könnten andere reaktive Spezies im Brunnenwasser enthalten sein, die einen Einfluss auf die Stabilität haben könnten oder bestehende Faktoren verstärken. So muss bei der Betrachtung von Antibiotikaanwendungen im Brunnenwasser z.B. die Fenton-Reaktion berücksichtigt werden (Tačić *et al.*, 2017). Bei dieser Reaktion werden reaktive Spezies aus Wasserstoffperoxid, das natürlicherweise in verschiedenen Wässern vorkommen kann, und Eisen-Ionen mit einem hohen oxidativen Potential gebildet (Sukul *et al.*, 2008b; Tačić *et al.*, 2017). In den Reaktionsgleichungen **1**, **2** und **3** sind einige Reaktionsmechanismen aufgeführt (Homem & Santos, 2011).



Fenton-Reaktionen werden als wichtiger Mechanismus zur Beseitigung von Verunreinigungen in der Abwasserbehandlung diskutiert (Costa *et al.*, 2020; Dias *et al.*, 2014). Studien, die bisher Sulfonamide und eisenhaltige Lösungen behandeln, zielen in erster Linie auf eine Optimierung der Wirkstoffreduzierung ab, um eine Anwendung in der Abwasserbehandlung zu ermöglichen. Die Identifizierung von Reaktionsprodukten und -mechanismen wird bislang nicht verfolgt. Insofern ist die Datenlage diesbezüglich unzureichend und es bedarf weiterer Untersuchungen.

4.1.2.3 Zusammenfassung und Ausblick

Sulfonamide und TMP gelten als stabile Antibiotika und werden nach deren Einsatz in Human- und Veterinärmedizin in verschiedenen Umweltkompartimenten nachgewiesen (Tačić *et al.*, 2017) (Tabelle 3.1). In den hier durchgeführten Untersuchungen konnte daher eine hohe Stabilität in verschiedenen Lösungen bestätigt werden. Neue Aspekte waren die Verwendung von Lösungen, wie sie unter anderem bei der Probenaufarbeitung in der Analytik eingesetzt werden und der lange Untersuchungszeitraum, sodass der Einfluss einer Lösung auf die Stabilität sowie Einflüsse von einzelnen Ionen abgeschätzt werden konnten. Beide Wirkstoffe zeigten eine hohe

Stabilität über den Zeitraum von 15 Monaten. SDZ wies im Vergleich zu TMP eine höhere Licht-Abhängigkeit auf.

In dieser Arbeit wurde auch der Einfluss von Eisen(III)-Ionen überprüft. Unter Lichteinfluss über einen Zeitraum von 50 Tagen wurden beide Wirkstoffe zwischen 4 und 12 % abgebaut. Ohne Licht und unter kühlen Bedingungen war TMP stabil, für SDZ wurden bis zu 3 % geringere Gehalte nachgewiesen. Bisher wurde in Studien zur Antibiotikastabilität das Verabreichen mit Brunnenwasser nicht berücksichtigt. Dies sollte in zukünftigen Wirkstoffstudien und auch in Zulassungsverfahren stärker beachtet werden. Dafür könnte man extreme und moderate Brunnenwasserbedingungen (verschiedene pH-Werte und Konzentrationen an Ionen und Huminstoffen) (Artinger *et al.*, 2000; Kamphues *et al.*, 2007) abbilden, um mögliche Einflüsse einschätzen und entsprechende Empfehlungen aussprechen zu können.

4.2 Methodenentwicklung und -validierung von Tylosin A

In der Literatur sind viele HPLC-UV-Methoden beschrieben, die Tylosin A (TYL A), seine Derivate Tylosin B, C, D und auch Transformationsprodukte nebeneinander detektieren und quantifizieren können. Ein Ziel der Entwicklung einer HPLC-UV-Methode war es, die Analysenzeit so kurz wie möglich zu halten, da in der Literatur häufig Laufzeiten von über 40 Minuten beschrieben sind (Ashenafi *et al.*, 2011; Chopra *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2019; Loke *et al.*, 2000). Dafür wurden HPLC-Säulen mit unterschiedlichen Säulenmaterialien (C18, C18 mit polaren oder TMS-Endcapping, Dualphasen, HILIC) sowie Eluenten mit verschiedenen Puffersystemen und -zusammensetzungen (Ammoniumacetat-Puffer/Methanol oder Acetonitril) getestet. Für verschiedene binäre Gradienten ergab sich keine hinreichende Trennung der Tylosin-Derivate. Daraufhin wurde eine ternäre Methode getestet mit Ammoniumacetat-Puffer, Methanol und Acetonitril (Nozal Nalda *et al.*, 2006). Anstelle der in der Literatur genutzten *Luna5u C18*-Säule wurde eine *Hypersil™ Gold PFP*-Säule verwendet, da mit der erstgenannten keine ausreichende Trennung möglich war. Die Analysenzeit konnte durch eine weitere Optimierung der Eluentenzusammensetzung auf 23 Minuten verkürzt werden.

Die Methode mit drei Eluenten wurde an einem Niederdruckgradientensystem umgesetzt. Dabei kam es in unregelmäßigen Abständen zu Retentionszeitverschiebungen der TYL-Derivate. Bei der Niederdrucktechnik wird nur eine Hochdruckpumpe zum Mischen der Eluenten verwendet (Gey, 2021). Bei einem Hochdruckgradientensystem benötigt jeder angeschlossene Eluent eine eigene Pumpe. Die hohen Anschaffungskosten durch die Pumpenanzahl ist ein Nachteil bei der Verwendung des Hochdruckgradienten (Röpke, 2013). Dafür kann es bei dem Niederdruckgradientensystem durch das Totvolumen oder verzögerte Ansaugphase der Pumpe und aufgrund von unterschiedlicher Kompressibilität der Lösungsmittel zu leichten Abweichungen im Mischungsverhältnis kommen (Röpke, 2013). Aus diesem Grund wurde ein pseudo-binärer Gradient entwickelt. Eluent A besteht aus 48 % Methanol in Ammoniumacetat-Puffer, Eluent B aus 25 % Acetonitril im gleichen Puffer und Eluent C aus reinem Acetonitril. Die Zusammensetzung der Eluenten orientiert sich im Verlauf des ternären Gradienten mit den reinen Lösungsmitteln (Abbildung 4.2 A). Während eines HPLC-Laufes war es somit möglich, zur gleichen Zeit immer nur zwei Eluenten anzusteuern (Abbildung 4.2 B). Das Vorgehen ermöglichte die ausreichende Trennung der Analyten bei gleichzeitig stabilen Retentionszeiten.

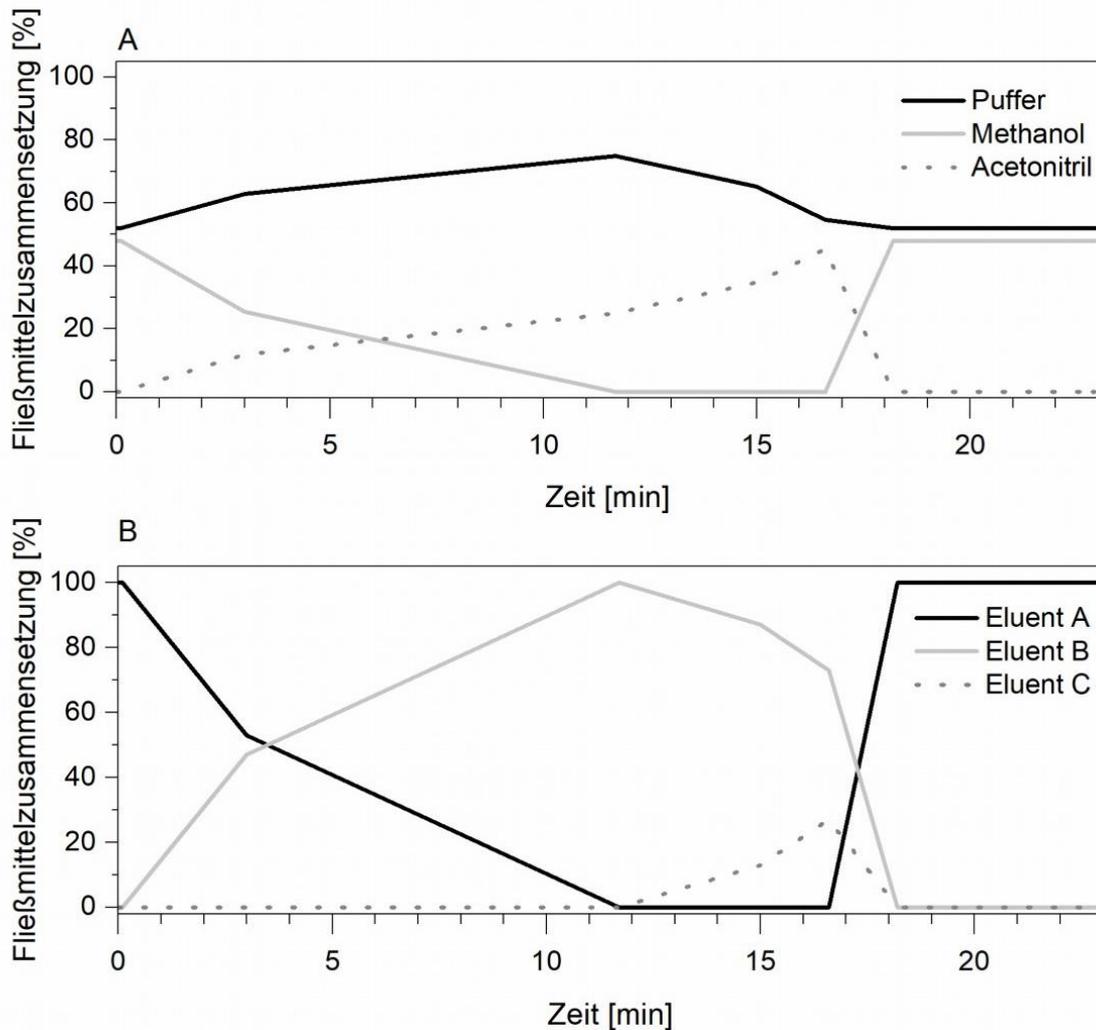


Abbildung 4.2: **A)** Darstellung des HPLC-UV-Gradienten für TYL A und Derivate, Anteile umgerechnet in Einzelreagenzien; **B)** Darstellung des pseudobinären Gradienten mit Mischeluenten.

Das Besondere an diesem Gradienten ist die Verwendung von zwei verschiedenen organischen Lösungsmitteln mit variablen Anteilen. Zu Beginn wird zusätzlich zum Puffer nur Methanol angewendet. Hierdurch ist eine Trennung von TYL B von TYL C möglich. Im Zuge der Analyse wird der Anteil von Acetonitril gesteigert, wodurch erfolgreich TYL D und TYL A im Chromatogramm getrennt werden (Abbildung 4.3).

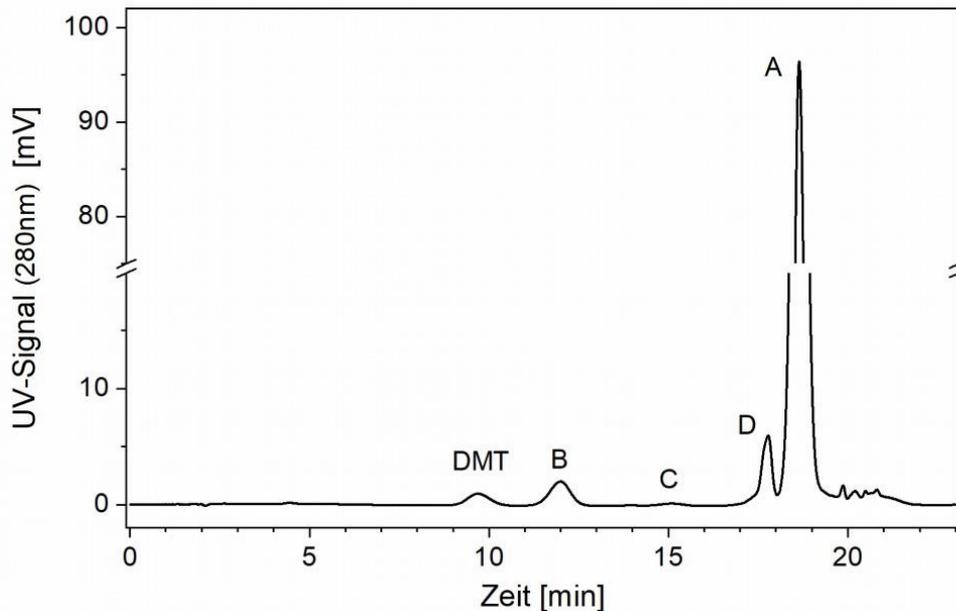


Abbildung 4.3: UV-Chromatogramm des Tylosin-Standards mit einer Konzentration von 100 µg/mL TYL A, detektiert bei 280 nm. A: TYL A; B: TYL B, C: TYL C, D: TYL D; DMT: Demycinosylytylosin; y-Achse unterbrochen.

Die Ermittlung der NWG und BG erfolgte, wie in Kapitel 4.1.1 für SDZ und TMP beschrieben, nach DIN 32645 mittels Kalibriergeradenverfahren mit 10 Konzentrationspunkten, die je dreimal injiziert wurden. Die Bestimmungsgrenze wurde mit $k = 3$ ermittelt. Für die anderen TYL-Derivate konnte auf Grund fehlender Standards keine Validierung durchgeführt werden.

Tabelle 4.8: Validierungsparameter von Tylosin A.

Parameter	TYL A
Nachweisgrenze [µg/mL]	0,2
Bestimmungsgrenze [µg/mL]	0,6
Linearitätsbereich [µg/mL]	25 - 150
Intraday-Präzision (RSD [%], n = 11)*	0,1
Interday-Präzision (RSD [%], n = 10)*	0,7

* Intraday- und Interday-Präzision wurden bei einer Konzentration von 100 µg/mL bestimmt.

In der Literatur findet man unterschiedliche Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für TYL A mit UV-Detektion. Ashenafi *et al.* konnten niedrigere Grenzen mit einer NWG von 0,06 µg/mL und BG von 0,2 µg/mL bestimmen (Ashenafi *et al.*, 2011). Srinivasan *et al.* beschrieben nur die NWG mit 0,05 µg/mL, die durch das Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 3 ermittelt wurde (Srinivasan *et al.*, 2012). Dagegen weisen Lin *et al.* mit MS-Detektion eine NWG von 0,35 µg/mL und eine BG von 0,55 µg/mL auf (Lin *et al.*, 2019). Die hier ermittelten NWG und BG wurden als ausreichend für

die Zielanalytik erachtet. In Bezug auf die Intraday-Präzision wird für die Chromatographie ein Wert von unter 1 % als zufriedenstellend eingestuft (Kromidas, 2011), was für beide ermittelten Präzisionen zutrifft.

Die entwickelte Methode entsprach somit den Anforderungen bezüglich der Basislinientrennung der Tylosinderivate sowie der Validierungsparameter und konnte für die Routineanalytik eingesetzt werden.

4.3 Entwicklung eines Modellbiofilms

Die Entwicklung des Modellbiofilms erfolgte mit Dr. Rafael Hernan Mateus-Vargas vom Institut für Tierhygiene von der Tierärztlichen Hochschule in Hannover (Kietzmann *et al.*, 2019). Ziel war es, einen Biofilm reproduzierbar herzustellen. An diesem sollten Einflüsse durch Konfrontationen mit diversen Antibiotika in einem Tränkwasserrohr nachgewiesen werden können. Während des Untersuchungszeitraums sollten Veränderungen des Biofilms sowie der Antibiotika untersucht werden. Im Vordergrund standen dabei die Untersuchungen auf

- einen möglichen Einfluss der verwendeten Antibiotika auf die koloniebildenden Einheiten (KbE) im Biofilm und in den planktonischen Lösungen;
- die Bildung von Transformationsprodukten;
- die Entwicklung von Antibiotika-Resistenzen.

Gegenstand dieser Arbeit waren die Untersuchungen an dem Biofilmbildner *Pseudomonas fluorescens*. Die Biofilmversuche mit *P. aeruginosa* wurden vom Projektpartner am Institut für Tierhygiene der Tierärztlichen Hochschule in Hannover durchgeführt und wurden zum Vergleich mit herangezogen (Hahne *et al.*, 2022). Bei der Beschreibung der beiden verwendeten Biofilme ist bei der Bezeichnung „Biofilm mit *P. fluorescens*“ oder „*P.-fluorescens*-Biofilm“ derjenige Biofilm gemeint, bei dem die Stämme *P. fluorescens* und *E. coli* zum Ansetzen des Biofilms verwendet wurden (Tabelle 4.9). Analog verhält es sich bei der Verwendung von „Biofilm mit *P. aeruginosa*“ und „*P.-aeruginosa*-Biofilm“. Hier wurden für die Ansetzlösungen zur Biofilmdarstellung die Stämme *P. aeruginosa* und *E. coli* verwendet.

Tabelle 4.9: Übersicht zur Beschreibung der beiden verwendeten Biofilme.

Verwendete Mikroorganismen		Begriff 1	Begriff 2
<i>E. coli</i>	<i>P. fluorescens</i>	Biofilm mit <i>P. fluorescens</i>	<i>P.-fluorescens</i> -Biofilm
<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Biofilm mit <i>P. aeruginosa</i>	<i>P.-aeruginosa</i> -Biofilm

4.3.1 Vorgehen zur Entwicklung des Modellbiofilms

Der zu entwickelnde bakterieller Biofilm sollte keine Monokultur, sondern eine Co-Kultur aus zumindest zwei Arten sein. Dabei fiel die Bakterienauswahl auf die Biofilmbildner *P. aeruginosa* oder *P. fluorescens* (Masák *et al.*, 2014) sowie auf einen Antibiotika-sensitiven *E. coli*-Stamm als Marker für eine mögliche Resistenzentwicklung. Diese drei Stämme konnten in Tränkwasser in

Geflügelhaltungsbetrieben nachgewiesen werden (Maes *et al.*, 2019). *E. coli* ist kein üblicher Wasserkeim, sondern gilt als fäkaler Kontaminant in Tränkwasserleitungen (Böger *et al.*, 2020; Schulz *et al.*, 2014).

Die Biofilmentwicklung ist von vielen Faktoren wie Temperatur, pH-Wert, Nährstoffgehalt, Oberflächenbeschaffenheit und der Hydrodynamik (z.B. Wasserfluss, Netzwerkaufbau, T-Stücke im Rohrsystem) abhängig (Hemdan *et al.*, 2021). Um ein gut reproduzierbares System zu entwickeln, wurde ein statisches Modell gewählt. Dabei können die Faktoren Temperatur, Nährstoffgehalt und pH-Wert gut eingestellt werden. Als Rohrmaterial wurde Polyvinylchlorid (PVC) ausgewählt, da dies in der Landwirtschaft und v.a. auch in der Geflügelhaltung als Material für Tränkwasserrohre weit verbreitet ist (Maharjan *et al.*, 2017).

Ein Versuchsansatz bestand aus sechs PVC-Rohren, wobei drei Rohre mit Bakterien für die Biofilmbildung beimpft und drei weitere Rohre als abiotische Kontrollen mit Minimalmedium (MM) befüllt wurden (Details s. Kapitel 5.5.1). Nach 7 Tagen wurde ein Rohrpaar, bestehend aus einem Biofilmrohr und einem mit MM gefüllten Rohr, mikrobiologisch untersucht. Dies beinhaltete die Ermittlung der Zellgehalte als koloniebildende Einheiten (KbE) pro Fläche. Aus diesem Wert lässt sich die Reproduzierbarkeit des Biofilmwachstums ableiten. Die Kontrollrohre mit MM sollten keine KbE aufweisen. Sie dienen als Nachweis für eine möglichst sterile Versuchsdurchführung und den Ausschluss einer (Kreuz)Kontamination. Für die differenzierte Bestimmung der Zellgehalte wurden für *P. fluorescens* ein Selektionsmedium verwendet und *E. coli* auf einem unspezifischen Medium bei 37 °C inkubiert, da Pseudomonaden bei dieser Temperatureinstellung nicht überleben (Hugh *et al.*, 1964).

Tabelle 4.10: Vergleich der Zellgehalte von Pseudomonaden und *E. coli* in Biofilmen aus dieser Arbeit (*P. fluorescens* und *E. coli*) und dem Biofilm mit Verwendung von *P. aeruginosa* (Hahne *et al.*, 2022).

Zellgehalte [log ₁₀ (KbE/cm ²)]	Biofilm mit <i>P. fluorescens</i>	Biofilm mit <i>P. aeruginosa</i>
<i>E. coli</i>	5,94 ± 0,24	4,07 ± 0,56
Pseudomonaden	5,68 ± 0,44	6,98 ± 0,35

Nach 7-tägiger Biofilmentwicklung waren die mittleren Zellgehalte von *E. coli* im Biofilm geringfügig höher als die von *P. fluorescens* (Tabelle 4.10). Übliche Standardabweichungen von Biofilmmodellen sind ± 0,5 log₁₀(KbE/cm²) und bei Vorliegen dieser wird von einer Wiederholbarkeit eines Modellbiofilms gesprochen (Goeres *et al.*, 2019; Parker & Hamilton, 2011). Die ermittelten Standardabweichungen mit 0,24 log₁₀(KbE/cm²) für *E. coli* und 0,44 log₁₀(KbE/cm²) für *P. fluorescens* belegen die Anzucht eines reproduzierbaren und gleichmäßigen Biofilms

(Tabelle 4.10). Somit konnte dieser Versuchsaufbau für Untersuchungen möglicher Interaktionen zwischen Antibiotika und den Bakterien im Biofilm angewendet werden.

Es gibt nur wenige Daten zu Zellgehalten von Biofilmen in Tränkwasserleitungen in Geflügelställen. In der Arbeit von Maes *et al.* (2019) wird beschrieben, dass bis dato keine *peer reviewed* Daten bezüglich einer mikrobiellen Kontamination auf ähnlichen Oberflächen gefunden werden konnten. Bei den von Maes *et al.* (2019) ermittelten Daten wurden fünf Geflügelställe in Belgien untersucht. Die aerobe Gesamtflora (total aerobic flora) wurde mit einer Spannweite von $0,57 - 7,70 \log_{10}(\text{KbE}/\text{cm}^2)$ bestimmt und bei den Pseudomonaden konnten Zellgehalte von $0,61 - 6,12 \log_{10}(\text{KbE}/\text{cm}^2)$ nachgewiesen werden. Der Mittelwert der aeroben Gesamtflora betrug $4,73 \pm 0,23 \log_{10}(\text{KbE}/\text{cm}^2)$ und die der Pseudomonaden $3,85 \log_{10}(\text{KbE}/\text{cm}^2)$. Die Summe von beiden Stämmen im *P.-fluorescens*-Biofilm betrug $6,15 \pm 0,26 \log_{10}(\text{KbE}/\text{cm}^2)$. Die Gesamtzellgehalte und die Zellgehalte der Pseudomonaden selbst waren im oberen Bereich der in der Landwirtschaft gefundenen Gehalte, die nach Maes *et al.* (2019) bestimmt wurden.

Im Vergleich zu den Pseudomonadengehalten im Modellbiofilm des Projektpartners mit *P. aeruginosa* konnten Unterschiede festgestellt werden (Tabelle 4.10)(Hahne *et al.*, 2022). Im Biofilm mit *P. aeruginosa* wurden mit mehr als einer logarithmischen Stufe Unterschied deutlich höhere Zellgehalte von *P. aeruginosa* bestimmt als in dem Biofilm mit *P. fluorescens*. Dies kann daran liegen, dass *P. aeruginosa* unter den angewandten Bedingungen (Raumtemperatur, Minimalmedium, PVC als Oberfläche) einen dichteren Biofilm bilden kann (Chang *et al.*, 2015; W. Kim *et al.*, 2013).

Im Kontrast zu den Pseudomonaden ergibt sich bei *E. coli* ein anderes Ergebnis. Die Zellgehalte an *E. coli* sind im *P.-aeruginosa*-Biofilm um fast zwei logarithmische Stufen niedriger als im Biofilm mit *P. fluorescens*. Das könnte bedeuten, dass *P. aeruginosa* einen Einfluss auf die Biofilmbildung von *E. coli* hat. Wie in Mirani *et al.* (2018) beschrieben wurde, konnte in Biofilmen mit der Co-Kultur *P. aeruginosa* cis-2-Decensäure detektiert werden, die den Aufbau des Biofilms von *E. coli* verhinderte. Dagegen wurde *P. fluorescens* in der Biofilmforschung bislang selten untersucht, sodass wenig über die gegenseitigen Einflüsse in einer Co-Kultur mit *P. fluorescens* beschrieben ist.

4.3.2 Überprüfung und Variationen des Versuchsaufbaus des Modellbiofilms

4.3.2.1 Bestimmung der koloniebildenden Einheiten in der Start suspension

Die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) wurde für die Einstellung einer definierten Bakterien suspension für beide Stämme verwendet. Die Messung beruht auf der Lichtstreuung, die mittels der Extinktion mit dem Photometer erfasst wird. In diesem Kapitel wird der Zellgehalt der

KbE pro mL bestimmt, der bei einem OD₆₀₀-Wert von 0,063 vorliegt (Tabelle 4.11). Zu Versuchsbeginn wurde die Start suspension der beiden Stämme auf jeweils einen OD₆₀₀-Wert von 0,125 eingestellt. Durch das Befüllen der PVC-Rohre mit den Suspensionen zu gleichen Anteilen beträgt der OD₆₀₀-Wert pro Stamm jeweils 0,063.

Tabelle 4.11: Zellgehalte der Bakterien suspension im PVC-Rohr bei einem OD₆₀₀-Wert von 0,063.

Bakterienstamm	Zellgehalt (KbE/mL)
<i>E. coli</i>	$1,6 \pm 0,4 \cdot 10^8$
<i>P. fluorescens</i>	$3,0 \pm 0,9 \cdot 10^7$

Die ermittelten Zellgehalte in der Bakterien suspension beider Stämme unterscheiden sich (Tabelle 4.11). Es gibt zu Zellgehalten in verschiedenen Bakterien suspensionen keine direkten Vergleichsdaten, da diese auch photometerabhängig sind (Stevenson *et al.*, 2016). Eine alternative photometrische Methode zur Einstellung einer Bakterien suspension ist der McFarland-Standard, der ebenfalls eine Trübungsmessung darstellt und mit einer Verdünnungsreihe von getrübbten Standardlösungen arbeitet (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012). Zur Einordnung der ermittelten Zellgehalte wird der McFarland-Wert mit den OD₆₀₀-Werten verglichen. Der McFarland-Standard mit einem Wert von 0,5 entspricht ungefähr einem OD₆₀₀-Wert von 0,08-0,10 (Jewell *et al.*, 2020) und einem Zellgehalt von $1,0 - 2,0 \cdot 10^8$ KbE/mL (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012). Der hier verwendete OD₆₀₀-Wert von 0,063 ist geringer als der zu erwartende OD₆₀₀-Wert vom McFarland-Standard von 0,5, sodass die zu ermittelnde KbE-Gehalte niedriger bestimmt werden sollten. Der *P. fluorescens*-Gehalt ist kleiner als der aufgeführte Bereich von $1,0 - 2,0 \cdot 10^8$ KbE/mL. Im Hinblick auf den eingestellten OD₆₀₀-Wert von 0,063 liegt dies in der erwarteten Größenordnung des McFarlands-Vergleichswertes. *E. coli* ist genau in dem KbE-Bereich des McFarland-Standards von 0,5 bestimmt und somit höher als erwartet.

Unterschiede in den Zellgehalten verschiedener Stämme können zum Beispiel mit der Größe von Bakterien und der Zellphase zusammenhängen (Rolfe *et al.*, 2012). Der Gehalt an *E. coli* ist ca. fünfmal höher als der Gehalt an *P. fluorescens*. Für den verwendeten Stamm *P. fluorescens* wurde die Zellgröße auf $(0,3 - 0,6 \times 1 - 2) \mu\text{m}^2$ bestimmt (Hugh *et al.*, 1964). Für den hier verwendeten Stamm von *E. coli* konnte in der Literatur keine Größenbeschreibung gefunden werden. Allgemein wird die Zellgröße von *E. coli* mit einer großen Spannbreite beschrieben und mit einem Durchschnitt von $(0,5 \times 2) \mu\text{m}^2$ angegeben (Kadner & Rogers, 2023). Dies entspräche der gleichen Dimension wie die Zellen von *P. fluorescens*. Ein anderer Faktor ist die Generationszeit, die bei

E. coli kürzer ist als bei Pseudomonaden (Mirani *et al.*, 2018). Somit könnte dies der Grund dafür sein, weshalb sich die Zellgehalte in der Suspension unterscheiden.

Auch wenn die Zellzahl beider Stämme in Suspension unterschiedlich ist, bildet sich der Biofilm zu fast gleichen Anteilen an *P. fluorescens* und *E. coli* aus (Tabelle 4.10). In Mirani *et al.* (2018) wird beschrieben, dass in der Co-Kultur aus *E. coli* und *P. aeruginosa* der Anteil von *E. coli* am Versuchsbeginn im Biofilm größer war, da *E. coli* schnell in den Biofilmmodus wechseln kann und eine kürzere Generationszeit besitzt. *P. aeruginosa* dagegen benötigt eine längere Umstellungszeit von dem planktonischen in den Biofilmstatus. Im Laufe des Versuchs stieg der Anteil von *P. aeruginosa* im Biofilm an. Mirani *et al.* (2018) verglichen die Zelloberflächenhydrophobizität und stellten fest, dass sich der hydrophobe Anteil im Laufe der Biofilmentwicklung bei *P. aeruginosa* erhöhte. Das deutet darauf hin, dass sich *P. aeruginosa* besser als *E. coli* an eine hydrophobe Oberfläche anhaften kann. Oberflächen können grundsätzlich Einfluss auf die Biofilmentwicklung nehmen und müssen bei Vergleichen mitbetrachtet werden (Donlan, 2002; Rosenberg & Kjelleberg, 1986). Mirani *et al.* (2018) führten die Versuche auf Glas durch, in dieser Arbeit wurden PVC-Rohre verwendet. Ein direkter Vergleich der beiden Arbeiten ist deswegen nicht möglich. Die Ergebnisse der Studien von Mirani *et al.* (2018) sprechen dafür, dass eine wachsende Zelloberflächenhydrophobizität von *P. fluorescens* dazu führt, dass eine Verdrängung der anfänglich in Zellgehaltszahlen-überlegenen *E. coli* stattfindet und sich der finale Biofilm zu nahezu gleichen Teilen aus beiden Bakterienarten zusammensetzt.

4.3.2.2 Einfluss auf den Biofilm durch Veränderung der Bakteriensuspensionsdichte und Zusammensetzung des Mediums

Es wurden zwei Experimente durchgeführt, um Einflüsse der Inkubationsbedingungen auf die Biofilmentwicklung zu testen (Tabelle 4.12). In einem Versuch wurde eine Bakteriensuspension mit einem geringeren OD₆₀₀-Wert eingesetzt. In einem anderen Ansatz wurde das verwendete Minimalmedium mit der dreifachen Konzentration der verwendeten Nährstoffe angesetzt (Details s. Kapitel 5.1.3.2).

Tabelle 4.12: Zellgehalte im Biofilm nach geringerer Einstellung des OD₆₀₀-Wertes und Verwendung eines höher konzentrierten Minimalmediums im Vergleich zum ursprünglichen Modellbiofilm.

Minimalmedium	OD ₆₀₀ -Wert	Zellgehalte [$\log_{10}(\text{KbE}/\text{cm}^2)$]	
		<i>E. coli</i>	<i>P. fluorescens</i>
einfach (Original)	0,063	5,94 ± 0,24	5,68 ± 0,45
einfach	0,036 *	5,08 ± 0,01	6,20 ± 0,03
dreifach	0,063	5,65 ± 0,03	6,18 ± 0,07

*Dieser Wert gibt den OD₆₀₀-Wert von *E. coli* an. Von *P. fluorescens* betrug der OD₆₀₀-Wert 0,030.

Beim Vergleich der Zellgehalte im einfachen Minimalmedium fällt bei den unterschiedlichen OD₆₀₀-Werten auf, dass der Anteil im Biofilm an *P. fluorescens* leicht höher und der Anteil an *E. coli* um eine logarithmische Stufe niedriger im Vergleich zum ursprünglichen Originalbiofilm ist (Tabelle 4.12). Dies könnte von der Nährstoffverfügbarkeit, die durch den geringeren Zellgehalt zu Beginn des Versuches im Verhältnis erhöht war, und der geringeren Konkurrenz der beiden Stämme abhängen (Choi *et al.*, 2013; James *et al.*, 1995). Dewanti und Wong (1995) wiesen nach, dass eine geringere Start suspension von *E. coli* auch zu einem geringeren Biofilmgehalt führte.

Der Mittelwert der Zellgehalte von *P. fluorescens* ist im Biofilm mit dreifachem MM genauso hoch wie bei dem Versuch mit einfachem MM mit geringerer Inkubationsdichte und befindet sich am oberen Rand der Werte vom Originalbiofilm unter Berücksichtigung der Standardabweichung. Der Mittelwert von *E. coli* ist etwas niedriger (um - 0,3) und ist am unteren Rand der Werte vom Originalbiofilm. Choi *et al.* (2013) zeigten, dass eine hohe Nährstoffverfügbarkeit nicht unbedingt eine höhere Biofilmentwicklung bewirkt. Es wurde dabei eher ein Einfluss auf die Gehalte der planktonischen Zellen nachgewiesen, der hier nicht überprüft wurde (Cowan *et al.*, 1991). Beim Vergleich des Originalbiofilms mit der Biofilmentwicklung mit höherem Nährstoffangebot lässt sich ein leichter Einfluss des Nährstoffgehaltes vermuten, aber statistisch nicht untermauern.

Die Unterschiede in der Biofilmdichte und -zusammensetzung bei verschiedenen Startbedingungen wie Nährstoffverfügbarkeit und Suspensionsdichte konnten bestimmt und eingeordnet werden. Im Fall von *P. fluorescens* zeigte sich eine geringere Start suspension sowie eine erhöhte Nährstoffverfügbarkeit für einen größeren Anteil im Biofilm. Dagegen erwies sich bei *E. coli* bei beiden Bedingungen eine Tendenz für einen geringeren Anteil am Biofilm.

4.3.3 Darstellung des Biofilms durch MS-Imaging mittels MALDI-MS

Mittels MS-Imaging können Substanzen über ihre *m/z*-Verhältnisse auf Oberflächen visualisiert werden. Das PVC-Rohr selbst war für eine direkte Aufnahme ungeeignet, da die Analyten des

Biofilms im Innenrohr nicht ionisiert und detektiert werden können. Somit wurde ein PVC-Coupon aus dem gleichen Material entwickelt, worauf der Biofilm unter gleichen Bedingungen im Rohr wachsen konnte (Details s. Kapitel 5.5.3). Ziel der Messung mittels MALDI-MS sollte die Visualisierung der Biofilmverteilung und der verwendeten Antibiotika hinsichtlich ihrer spezifischen m/z -Verhältnisse sein. Besondere Beachtung lag dabei auf den in Bakterienzellen enthaltenen Phospholipiden sowie auf die vorhandene EPS, um die Zellverteilung und spezifische Biofilmmatrix zu lokalisieren. Die Durchführung der MALDI-Messungen erfolgte im Arbeitskreis von Prof. Spengler an der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Um erste Eindrücke des Biofilms zu gewinnen, erfolgten Aufnahmen mittels Lichtmikroskop. In Abbildung 4.4 ist eine Aufnahme des Biofilms auf PVC gezeigt. Durch einen Computerabsturz gingen die Daten zur Skalenaufteilung leider verloren. Deshalb wurde die Skalierung anhand von einer späteren Mikroskopaufnahme abgeschätzt.

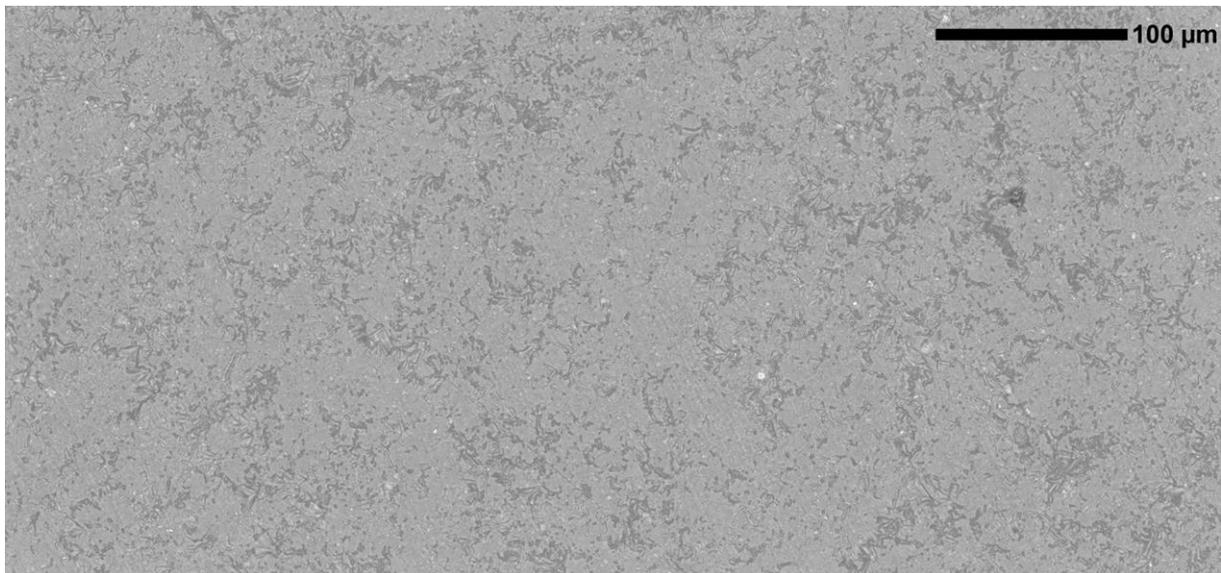


Abbildung 4.4: Mikroskopaufnahme des Modellbiofilms auf dem PVC-Coupon; Größenverhältnisse abgeschätzt: ca. 650 x 300 μm^2 .

Die Aufnahmen belegen, dass die Zellen nicht flächendeckend auf dem PVC-Coupon verteilt sind. Es sind Zellansammlungen sowie einzelne, nicht dicht zueinander lokalisierte Zellen zu erkennen. Die Morphologie von Biofilmen hängt von vielen Faktoren wie der Bakterienart, der Oberfläche, des Mediums und der Strömung ab (Dalton *et al.*, 1994; Gunther IV & Chen, 2009; A. Kumari *et al.*, 2018). Junge Biofilme aus *P. fluorescens* wurden oft als Mikrokolonien und Zellcluster beschrieben, was zu der oben aufgeführten Abbildungsbeschreibung passen könnte (Dynes *et al.*, 2009; Heydorn *et al.*, 2000). Ein junger Biofilm von *P. aeruginosa* nahm in den Studien von Heydorn *et al.* (2000) dagegen die Oberfläche gleichmäßig zu 98 –100 % ein.

Nach den lichtmikroskopischen Aufnahmen erfolgten Betrachtungen zum Ionisationsvermögen der verwendeten Substanzen sowie die Eignungsprüfung der MALDI-Matrix-Substanz 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB). Dieser wurde in der Literatur für die Detektion von Biofilmen mittels MALDI als geeignet beschrieben (Hasan *et al.*, 2011). Es zeigte sich, dass DHB auch zur Ionisation der verwendeten Antibiotika bei einer direkten Auftragung auf einer PVC-Oberfläche geeignet war (Anhang 7.2.1). Daraufhin wurde ein Biofilm auf dem PVC-Coupon gezüchtet und mit den Analyten konfrontiert. Auch auf der Biofilmmatrix konnten die Analyten gut detektiert werden, sodass DHB für die weiteren Messungen als MALDI-Matrix-Substanz eingesetzt wurde.

Zuerst wurden Aufnahmen von unbehandelten PVC-Coupons und von PVC-Coupons mit Biofilm ohne Antibiotika mit einer m/z -Datenaufnahme von 200 bis 800 durchgeführt. Dieser Bereich erfasst die Antibiotika SDZ und TMP sowie Phospholipide. Phospholipide sind Bestandteil der äußeren Zellmembran von gramnegativen Bakterien und können als Marker für die Bakterienzellen genutzt werden (Kadner & Rogers, 2023). Die Signale des unbehandelten PVC-Coupons störten die Analyse der Phospholipide und Antibiotika nicht. Die Massenspektren wurden mittels der Software XCalibur ausgewertet.

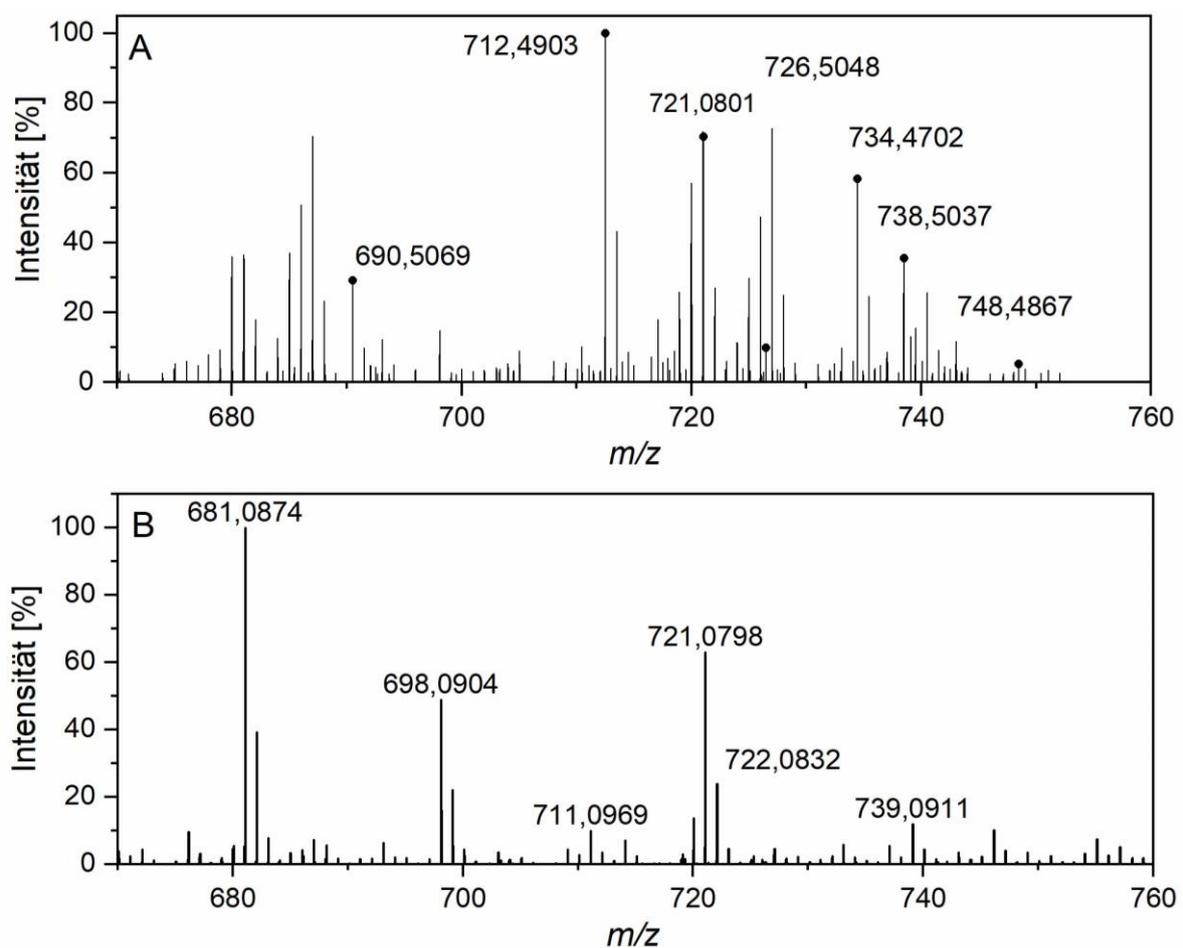


Abbildung 4.5: Massenspektren von PVC-Coupons mit **A**) Biofilm (gekennzeichnet sind typische m/z -Verhältnisse von Phospholipiden) und **B**) ohne Biofilm mit m/z -Verhältnis des DHB-Matrix-Standards von 721,08.

Im Massenspektrum fallen einige m/z -Verhältnisse auf, die aufgrund der ersten Nachkommastelle von 5 ($xxx,5$) unter anderem den Phospholipiden zugeordnet werden können (Abbildung 4.5 A, Anhang 7.1.2: Strukturvorschläge von metaspace2020.eu, Palmer *et al.*, 2016). Beim Vergleich des Coupons ohne Biofilm waren diese m/z -Verhältnisse nicht vorhanden (Abbildung 4.5 B). Einige Phospholipide konnten mit verschiedenen Addukten (+H, +Na, +K und +2 Na-H) detektiert und für einen Biofilm mit *E. coli* bereits nachgewiesen werden (Lanni *et al.*, 2014; H. Li *et al.*, 2016).

In Abbildung 4.6 sind neben einer Lichtmikroskopaufnahme auch die zum gleichen Ausschnitt zugehörigen m/z -Verhältnisse zweier Phospholipide (aus Abbildung 4.5 entnommen) sowie das m/z -Verhältnis von 365,1054, einer möglichen Dihexose, abgebildet. Die Auswahl der Phospholipide fiel auf die m/z -Verhältnisse von 712,4887 und 726,5043, weil beide durch verschiedene Addukte abgesichert waren. Das m/z -Verhältnis von 365,1053 wurde in metaspace2020.eu als Dihexose vorgeschlagen. Dihexosen wurden in anderweitigen Biofilmversuchen bereits als Bestandteil von Biofilmen nachgewiesen (Kavita *et al.*, 2011). Deshalb könnte das m/z -Verhältnis von 365,1053 eine Markersubstanz für die EPS des Modellbiofilms sein. Die Abbildung 4.6 zeigt einen Biofilm mit TYL A. Dies war der einzige Versuch bei dem eine Lichtmikroskopaufnahme und MSI direkt miteinander verglichen werden konnten. Bei dem Versuch mit dem Modellbiofilm ohne Antibiotika wurde die Stelle auf dem optischen Bild nicht markiert und konnte somit nicht verglichen werden.

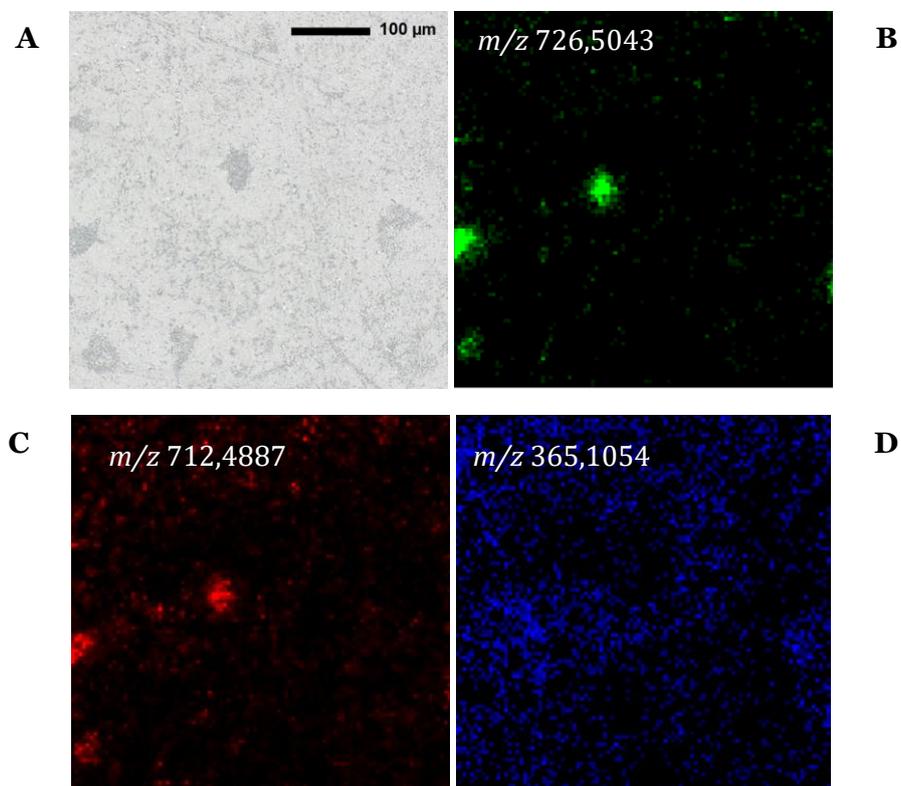


Abbildung 4.6: **A)** Mikroskopaufnahme eines Biofilmausschnitts ($500 \times 500 \mu\text{m}^2$) mit zugehörigen MALDI-MS-Bildern (aufgenommener Massenbereich: m/z -Verhältnisse von 250 – 1000): **B)** Phospholipid- m/z -Verhältnis von 726,5043

(grün); C) Phospholipid- m/z -Verhältnis von 712,4887 (rot); D) m/z -Verhältnis von 365,1053 entspricht einer Dihexose als $[M+Na]^+$ (blau).

Die beiden Phospholipide (m/z -Verhältnisse von 712,4887 und 726,5043) sind deutlich an den Stellen zu sehen, an denen auf der Mikroskopaufnahme die Zellansammlungen des Biofilms lokalisiert sind. Dagegen ist das m/z -Verhältnis von 365,1053 gleichmäßiger verteilt und nicht auf die Zellhaufen konzentriert. Somit konnten die vorgeschlagenen Phospholipide den Zellen des Biofilms zugeordnet werden. Das m/z -Verhältnis von 365,1053 konnte nicht eindeutig als EPS-Markersubstanz zugeordnet werden. Hierfür wären weitere umfangreiche Analysen notwendig gewesen. In den folgenden Untersuchungen wurde die Substanz dennoch für weitere Betrachtungen zur Biofilmbeschreibung herangezogen.

Weitere typische EPS-Markersubstanzen für Biofilme sind Signale des Quorum Sensing (QS) wie *N*-Acyl-Homoserinlaktone (AHL), 4-Chinolone, Pigment-Signale und Sekundärsignale (Kapitel 3.3.1, Diggle *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2019; Papenfort & Bassler, 2016). Keines der in der Literatur beschriebenen AHL sowie die 4-Chinolone-Signale, wie das *Pseudomonas*-Chinolone-Signal (PQS), konnten eindeutig und mit annehmbarer Intensität im Massenspektrum detektiert werden. Die Pyoverdine besitzen mit Massen von 1000 bis 1800 g/mol höhere m/z -Verhältnisse im einfach geladenen Zustand als der aufgenommene Massenbereich (Linget *et al.*, 1992; Meyer *et al.*, 2008; Nadal Jimenez *et al.*, 2012). Die verschiedenen Ladungszustände (z.B. doppelt geladen) wurden mit in die Suche von bekannten Pyoverdinen aufgenommen, konnten aber nicht detektiert werden (Linget *et al.*, 1992). Sekundärsignale, wie die sekundären Botenstoffe und die diffusionsfähigen Signalfaktoren, wurden ebenfalls untersucht. Darunter konnte nur das protonierte Addukt von cAMP detektiert werden, das aber ebenfalls in der Kontrollprobe ohne Biofilm nachgewiesen wurde. Deshalb konnte es sich nicht um cAMP handeln. Andere sekundäre Botenstoffe wie c-di-GMP und Fettsäuren waren nicht detektierbar.

In der Literatur konnten QS-Signale wie AHL mittels MALDI-Technik nachgewiesen werden (Y. W. Kim *et al.*, 2015; Lanni *et al.*, 2014; Leipert *et al.*, 2017). Leipert *et al.* (2017) vermuteten bei ihren Untersuchungen, dass die Messung für AHL nicht empfindlich genug war. Aus diesem Grund wurden die Proben zur Detektion von AHL oft mit Girard Reagenz T derivatisiert (Y. W. Kim *et al.*, 2015). Die geringe Empfindlichkeit und Konzentration könnten in den hier untersuchten Proben Ursache für die nicht detektierbaren AHL-Signale sein.

Weitere EPS wie Polysaccharide sind vor allem in höheren m/z -Bereichen, aber auch im Bereich der m/z -Verhältnisse von 400 bis 900 zu erwarten (Hasan *et al.*, 2011). Es konnten mittels Datenbanken (metaspace) keine Polysaccharide identifiziert werden. Bei einem zwei Monate alten Biofilm konnten nach Abnahme von der Oberfläche verschiedene m/z -Verhältnisse von Polysacchariden im positiven Modus detektiert werden (Hasan *et al.*, 2011). Aufgrund des Alters der von Hasan *et al.* (2011) verwendeten Biofilme waren in diesem höchstwahrscheinlich mehr

Polysaccharide vorhanden als in dem Biofilm der hier durchgeführten Studie. Durch die daraus resultierende Aufkonzentrierung konnte die Nachweisgrenze weiter herabgesetzt werden. Deshalb sind die Daten mit dem in dieser Arbeit verwendeten Modellbiofilm nicht vergleichbar. Auch in anderen Veröffentlichungen wird eine vorgelagerte Extraktion der EPS beschrieben (Kavita *et al.*, 2011). Durch diesen Arbeitsschritt ist eine Visualisierung der EPS- und Zellverteilung im Biofilm in nativer Form jedoch nicht mehr möglich und wurde nicht angewendet.

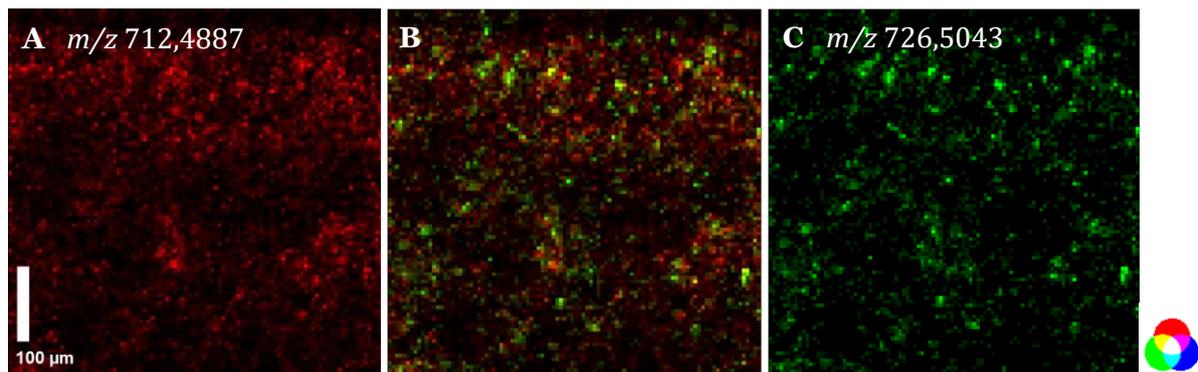


Abbildung 4.7: MALDI-MSI des Modellbiofilms ohne Antibiotikakonfrontation (Aufnahmebereich $500 \times 500 \mu\text{m}^2$, aufgenommener Massenbereich der m/z -Verhältnisse von 200 – 800); **A**) MSI des m/z -Verhältnisses von 712,4887 (rot); **B**) Überlagerung der Ionenbilder aus A und C; **C**) MSI des m/z -Verhältnisses von 726,5043 (grün).

Das MALDI-MSI des Biofilms ohne Antibiotikakonfrontation (Abbildung 4.7, Vergleich optisches Bild: Abbildung 4.4) zeigt, dass das m/z -Verhältnis von 712,4887 flächendeckend (Abdeckung 94 %) mit Hotspots verteilt ist. Das m/z -Verhältnis von 726,5043 ist ebenfalls über die Fläche verteilt mit einer geringeren Abdeckung von 26 %, aber mit einigen deutlichen hervorgehobenen Hotspots.

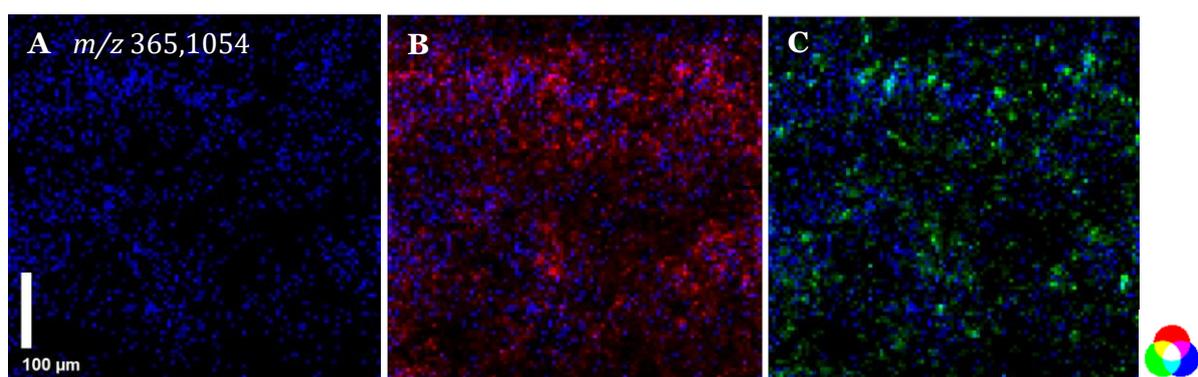


Abbildung 4.8: MALDI-MSI des Modellbiofilms ohne Antibiotikakonfrontation (Aufnahmebereich $500 \times 500 \mu\text{m}^2$, aufgenommener Massenbereich der m/z -Verhältnisse von 200 – 800); **A**) MSI des m/z -Verhältnisses von 365,1054 (Dihexose, blau); **B**) Überlagerung der Ionenbilder von A und des m/z -Verhältnisses von 712,4887 (Phospholipid, rot); **C**) Überlagerung der Ionenbilder von A und des m/z -Verhältnisses von 726,5043 (Phospholipid, grün).

Die als EPS-Markersubstanz diskutierte Dihexose ist über die untersuchte Fläche verteilt (Abbildung 4.8 A). Die Signalstärke ist geringer als bei den Phospholipiden. Beim Abgleich der

Dihexose- und Phospholipid-Signale wurde keine direkte lokale Übereinstimmung gefunden (Abbildung 4.8 B und C). Die Verteilung der EPS ist unabhängig von den Bakterien und somit von den Phospholipiden. Das ungleiche Auftreten spricht für das Signal der Dihexose als EPS.

Mittels MALDI-MSI konnten Verteilungsbilder verschiedener Substanzen für den Modellbiofilm erstellt werden. Es konnten zwei Phospholipide identifiziert werden, die die Zellen auf dem optischen Bild abbildeten. Das Signal für eine Dihexose wurde detektiert, die die Verteilung der EPS auf dem Coupon darstellen könnte. Andere EPS wie Polysaccharide und Proteine sowie weitere QS-Signale konnten auf diesem Weg ohne weitere Aufarbeitung nicht detektiert werden. Somit ist diese beschriebene MALDI-MS-Methode ohne weitere Aufarbeitung geeignet, um die Zellverteilung des Biofilms mittels der Phospholipide sowie das Signal für eine Dihexose als Hinweis auf die EPS auf einem PVC-Coupon darzustellen.

4.4 Interaktionen zwischen Modellbiofilm und Veterinärantibiotika

Die Verabreichung von Antibiotika in der Geflügelhaltung über das Tränkwassersystem ist eine schnelle und einfache Methode, um viele Tiere gleichzeitig behandeln zu können (Vermeulen *et al.*, 2002). In diesem Kapitel soll der gegenseitige Einfluss von dem in Kapitel 4.3 entwickelten Modellbiofilm und verschiedenen Veterinärantibiotika dargestellt werden. Verglichen werden die Modellbiofilmresultate mit einem parallel entwickelten Modellbiofilm vom DBU-Projektpartner in Hannover, der anstelle von *P. fluorescens* den Biofilmbildner *P. aeruginosa* verwendete (Hahne *et al.*, 2022; Kietzmann *et al.*, 2019). Die gemeinsame Diskussion der Ergebnisse erfolgt in Kapitel 4.4.5.

4.4.1 Aufbau des Versuchs

In Kapitel 0 wurde beschrieben, wie der hier verwendete Modellbiofilm hergestellt wurde (detailliert im experimentellen Teil 5.5.1.2). Nach der erfolgreichen Anzucht des Modellbiofilms wurde ein Biofilmrohr mit Antibiotika (AB) konfrontiert und ein anderes Biofilmrohr wurde ohne AB-Zusatz als biotische Kontrolle mitgeführt (Rohrbezeichnungen Abbildung 4.9; schematische Darstellung der vollständigen Versuchsdurchführung siehe Abbildung 5.1). Zusätzlich wurden zwei Rohre ohne Biofilm mitgeführt. Davon diente ein Rohr als abiotische Kontrolle (AB-Zusatz in MM), das andere wurde nur mit MM befüllt. Täglich wurde aus jedem Rohr eine Probe entnommen und der AB-Gehalt mittels HPLC-UV analysiert (Kapitel 4.4.2). Nach 7 Tagen wurde die Biofilmdichte und -zusammensetzung bestimmt (Kapitel 4.4.3). Ein Zusammenhang zwischen der AB-Zugabe und den Zellgehalten in der planktonischen Lösung sollte ebenfalls untersucht werden. Die Bakterien wurden nach Versuchsdurchführung kryokultiviert und auf Resistenzentwicklung geprüft (Kapitel 4.4.3.3). Eine mögliche Verteilung der Antibiotika auf dem Modellbiofilm mit *P. fluorescens* wurde mittels MS-Imaging mit MALDI-MS untersucht und visualisiert.

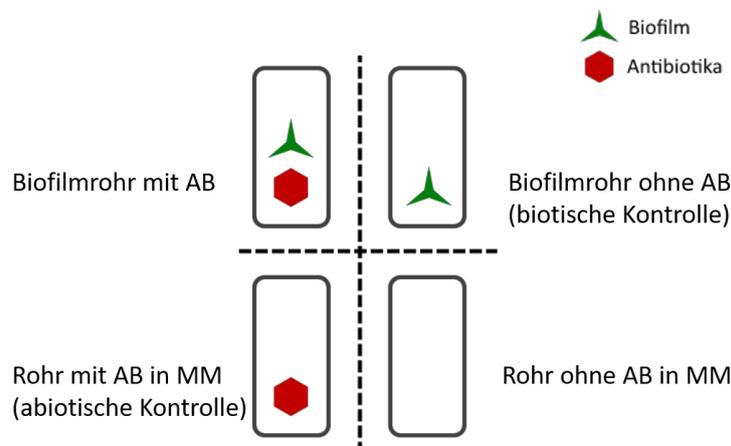


Abbildung 4.9: Rohrbezeichnungen der Biofilmversuche.

Die Konfrontation der Modellbiofilme wurde zuerst mit dem Kombinationspräparat Trimetostat® vom DBU-Projektpartner aniMedica GmbH durchgeführt. Trimetostat® ist eine Suspension aus Sulfadiazin und Trimethoprim in einem Verhältnis von 5:1 und ist nach Herstellerangaben für die Applikation über Tränkwassersysteme geeignet (Kietzmann *et al.*, 2019). In weiteren Versuchen wurde das Makrolid Tylosin A (TYL A) zur Konfrontation verwendet, das weniger erforscht ist und vor allem in der Tiermedizin eingesetzt wird (Löscher *et al.*, 2014).

4.4.2 Einfluss des Modellbiofilms auf Veterinärantibiotika

4.4.2.1 SDZ und TMP

Die Antibiotika-Gehalte in den PVC-Rohren wurden mittels HPLC-UV mittels externer Kalibration bestimmt. Die Darstellung erfolgt in prozentualer Form, wobei die Bezugskonzentration der Wirkstoffgehalt in der abiotischen Kontrolle am Tag 0 ist.

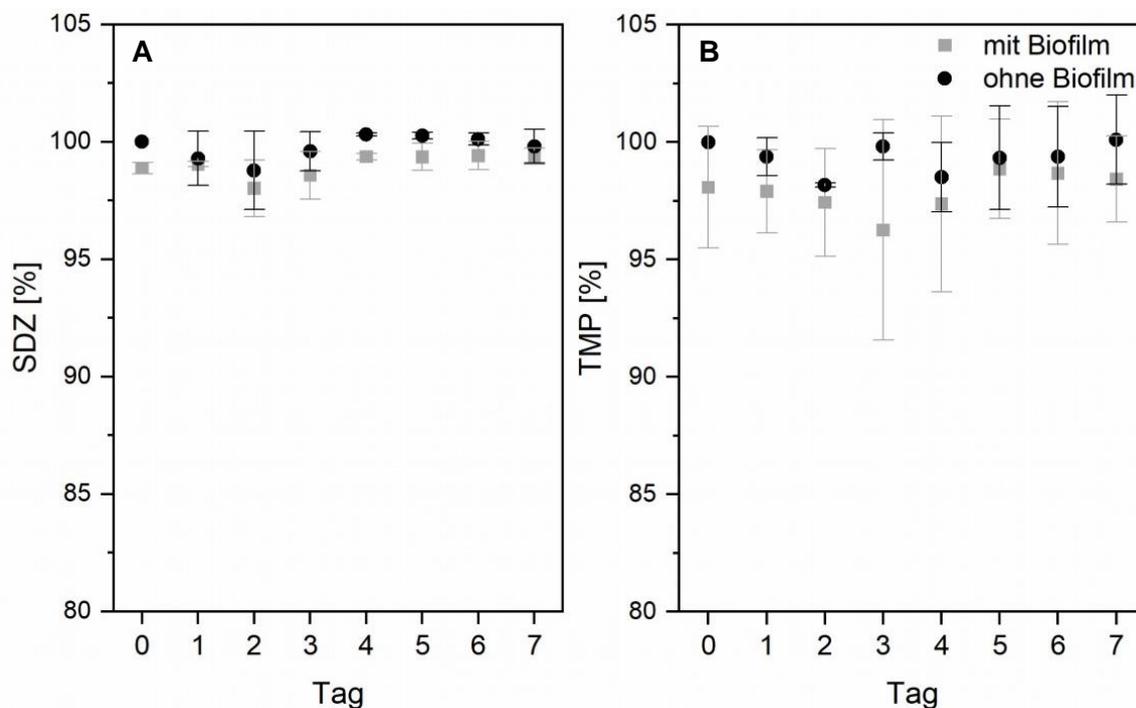


Abbildung 4.10: A) SDZ- und B) TMP-Gehalte im Versuchszeitraum von Tag 0 bis Tag 7 im Modellbiofilm mit *P. fluorescens* und *E. coli*; Startkonzentrationen: SDZ 150 mg/L; TMP 30 mg/L; alle Werte prozentual bezogen auf den Wirkstoffgehalt der abiotischen Kontrolle am Tag 0 (T0); an den Versuchstagen T0, T4 und T5 von SDZ sind die Standardabweichungen so gering, dass sie nicht sichtbar sind.

Die Wirkstoffgehalte zeigten über den Versuchszeitraum nur minimale Veränderungen im jeweiligen Rohr. Für jeden Versuchstag waren die Mittelwerte der doppelten Probenentnahme im Biofilmrohr für beide Wirkstoffe geringfügig niedriger als in den abiotischen Kontrollrohren (Abbildung 4.10). Der gemittelte Konzentrationsunterschied aller Probenentnahmetage war zwischen dem Biofilmrohr und der abiotischen Kontrolle bei SDZ und TMP signifikant verschieden (Tabelle 4.13 und Tabelle 4.14).

Die entsprechenden Daten für den Modellbiofilm mit *P. aeruginosa* und *E. coli* vom Projektpartner zeigten ein ähnliches Bild (Abbildung 4.11) (Hahne *et al.*, 2022).

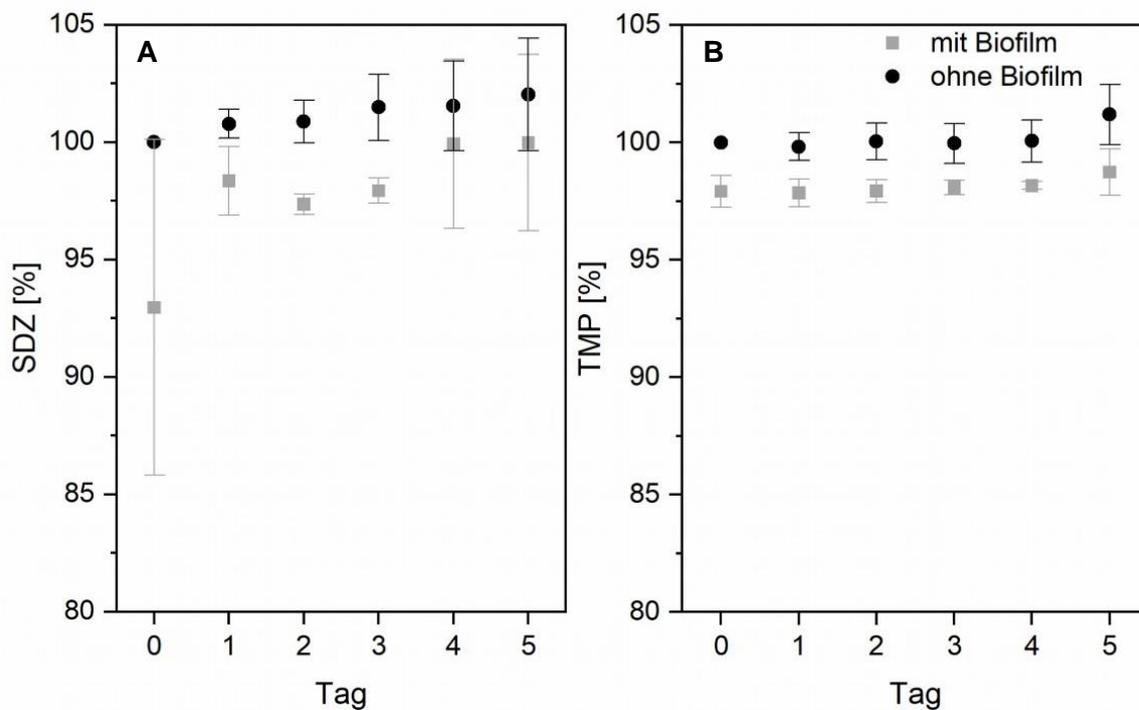


Abbildung 4.11: A) SDZ- und B) TMP-Gehalte im Versuchszeitraum von Tag 0 bis Tag 5 im Modellbiofilm mit *P. aeruginosa* und *E. coli*; alle Werte prozentual bezogen auf den Wirkstoffgehalt der abiotischen Kontrolle am Tag 0 (T0); (Hahne *et al.*, 2022).

Die SDZ- und TMP-Gehalte waren über den Anwendungszeitraum auf ungefähr gleichbleibendem Niveau. Die Konzentrationen in den Biofilmrohren waren geringer als in den abiotischen Kontrollen (Tabelle 4.13). Dabei zeigte sich über den Versuchszeitraum, dass im Biofilm mit *P. aeruginosa* die SDZ-Gehalte zwischen 2 und 7 % niedriger als die der Kontrolle lagen. Im Biofilm mit *P. fluorescens* war der Effekt mit ca. 1 % geringer.

Tabelle 4.13: SDZ-Ergebnisse bei der Konfrontation des Biofilms und der abiotischen Kontrolle ohne Biofilm (MM).

Probentage	SDZ-Gehalt [%]			
	<i>P.-fluorescens</i> -Biofilm		<i>P.-aeruginosa</i> -Biofilm	
	Biofilm	MM	Biofilm	MM
Probentag T0	98,9 ± 0,3	100	93,0 ± 7,2	100
Mittelwert aller Probentage	99,0 ± 0,5 *	99,8 ± 0,5	97,8 ± 2,4 **	101,1 ± 0,7

Statistik zwischen Biofilmrohr und Kontrolle (MM): * *t*-Test; $p = 0,010$; ** *t*-Test; $p = 0,012$.

Bei TMP ähnelten sich die Differenzen für beide Modellbiofilme zwischen Biofilm und abiotischer Kontrolle (Tabelle 4.14). Im Biofilm mit *P. fluorescens* betrug der verringerte Gehalt 97,9 % und im Biofilm mit *P. aeruginosa* 98,1 %. Die TMP-Gehalte zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen Biofilmrohr und abiotischer Kontrolle (Tabelle 4.14).

Tabelle 4.14: TMP-Ergebnisse bei der Konfrontation des Biofilms und der abiotischen Kontrolle ohne Biofilm (MM).

Probentage	TMP-Gehalt [%]			
	<i>P.-fluorescens</i> -Biofilm		<i>P.-aeruginosa</i> -Biofilm	
	Biofilm	MM	Biofilm	MM
Probentag T0	98,1 ± 2,6	100	97,9 ± 0,7	100
Mittelwert aller Probentage	97,9 ± 0,8 *	99,3 ± 0,6	98,1 ± 0,3 **	100,2 ± 0,5

Statistik zwischen Biofilmrohr und Kontrolle (MM): * *t*-Test $p = 0,002$; Mann-Whitney-Test $p = 0,003$ ** Mann-Whitney-Test $p = 0,002$.

Ein möglicher Einfluss der Biofilmmatrix auf die Konzentrationsbestimmung konnte bei der ersten Probenahme ausgeschlossen werden, da hier noch keine Matrix in Lösung vorlag. Ein Matrixeffekt am Ende des Versuches wurde durch Standardzugabe zu einer sterilfiltrierten Biofilmmatrix ausgeschlossen (Kapitel 7.1.2). Demnach scheinen die beiden Modellbiofilme selbst unterschiedlich starken Einfluss auf die AB-Gehalte zu nehmen. Die Matrix eines Biofilms besteht aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS), die aus Polysacchariden, Proteinen, extrazellulärer DNA, Lipiden und Stoffwechselprodukten bestehen (Flemming & Wingender, 2010). Daraus ergeben sich viele Möglichkeiten zur Interaktion von AB mit der EPS des Biofilms. Wirkstoffe könnten an die Matrix sorbieren oder durch die Matrix diffundieren. Dies sind bekannte Mechanismen von Biofilmen zur Abwehr von Xenobiotika (Stewart, 2015). Als Konsequenz können sie im Medium bereits bei der ersten Probenahme nicht mehr detektiert werden.

Vor dem Hintergrund, dass die Wirkstoffe möglicherweise durch den Biofilm diffundierten oder an der Oberfläche sorbierten, wurde am Ende des Versuchs die Lösung, womit der Biofilm von der Rohrwand gelöst wurde (Biofilm-PBS-Lösung, siehe experimenteller Teil 5.5.1.3) ebenfalls mittels HPLC-UV auf SDZ und TMP hin untersucht. In dem Modellbiofilm mit *P. fluorescens* konnte für das Biofilmrohr mit AB ein SDZ-Gehalt unter der BG detektiert werden. In der abiotischen Kontrolle lag der Gehalt und der NWG. Bei dem Modellbiofilm mit *P. aeruginosa* konnten in der PBS-Lösung des Biofilmrohrs 7 bis 30-mal höhere SDZ-Gehalte als in der abiotischen Kontrolle bestimmt werden (Hahne *et al.*, 2022). Somit konnte SDZ in beiden Modellbiofilmen in der PBS-Lösung nach dem Abspülen der planktonischen Zellen und leichtanhaftenden Wirkstoffen noch

nachgewiesen werden. Dies bestätigt die Annahme, dass die Wirkstoffe in den Biofilm diffundieren und/oder an ihm sorbieren.

4.4.2.2 Tylosin A

Die Proben zu den Biofilmversuchen für TYL A wurden mit der im Kapitel 4.2 validierten Methode gemessen und auf den Gehalt von TYL A untersucht.

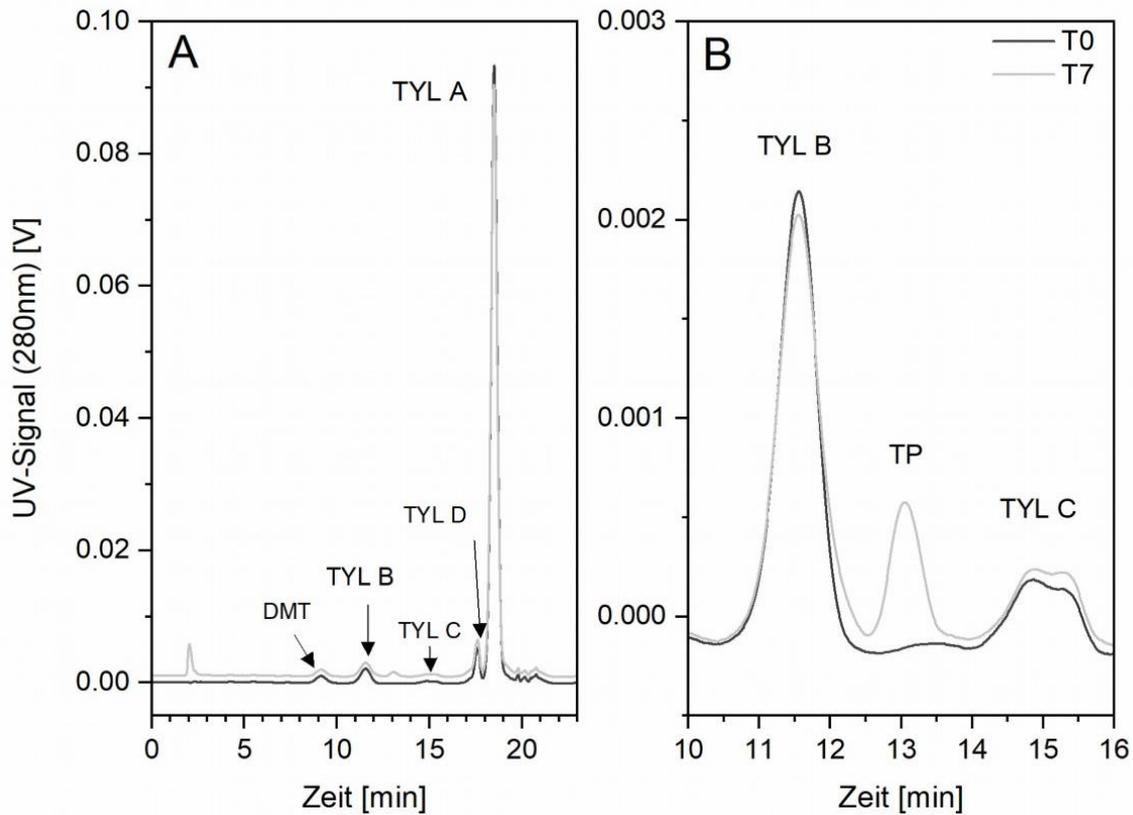


Abbildung 4.12: UV-Chromatogramme: **A)** Versuchstag 0 und 7 aus dem Biofilmrohr mit TYL-A-Konfrontation, DMT: Demecinosyltylosin; **B)** Teilausschnitt des linken Chromatogrammausschnittes mit Kennzeichnung des Transformationsproduktes (TP).

Beim Übereinanderlegen der UV-Chromatogramme der Biofilmproben von Versuchstag 0 und 7 wurde bei einer Retentionszeit von 13 min ein neuer Peak detektiert, der in der abiotischen Kontrolle nicht nachgewiesen werden konnte (Abbildung 4.12 B). Zusätzlich nahm die Peakfläche von TYL A der Proben aus dem Biofilmrohr im Versuchszeitraum ab.

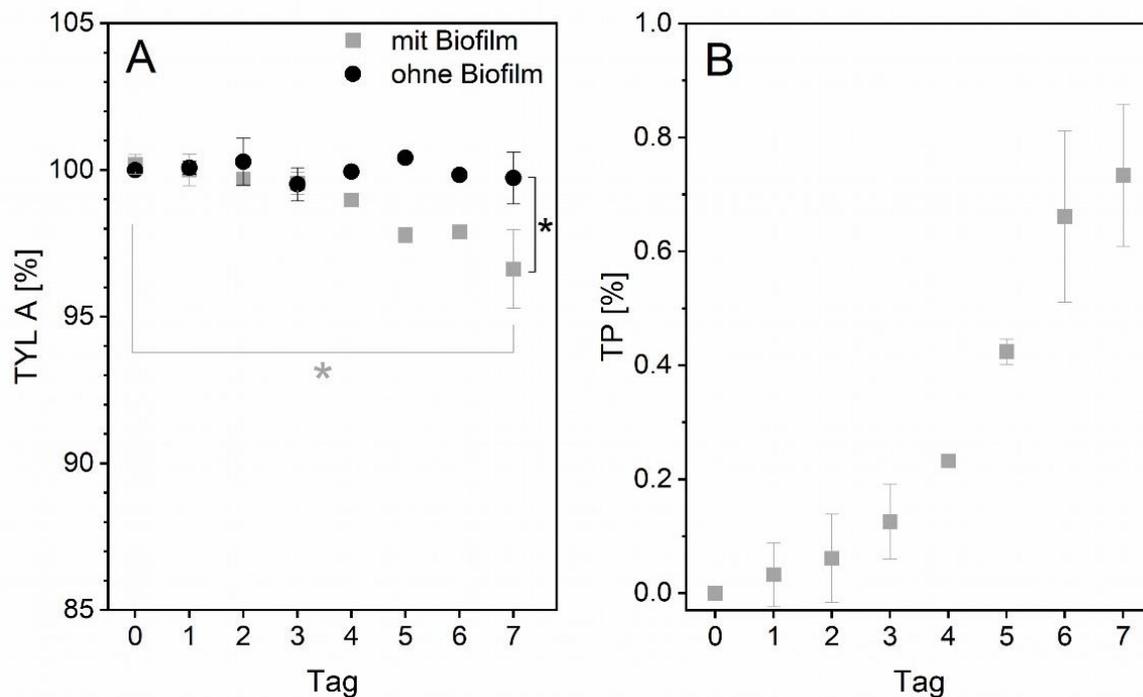


Abbildung 4.13: **A)** TYL-A-Gehalte über den Versuchszeitraum von 7 Tagen; alle Werte prozentual bezogen auf den Wirkstoffgehalt der abiotischen Kontrolle am Tag 0 (T0); **B)** relativer Transformationsproduktgehalt (TP) bezogen auf den Tagesstandard von TYL A (100 µg/mL), Versuchstag 4 wurde nur in einem Versuch mit doppelter Probenentnahme durchgeführt. Bei Punkten ohne erkennbaren Fehlerbalken fällt die Standardabweichung so klein aus, dass sie hinter dem Datenpunkt verschwindet; * ANOVA $p < 0,005$.

Die Gehalte von TYL A in der ersten Probenahme (Tag 0) unterschieden sich nicht zwischen dem Biofilmrohr und der abiotischen Kontrolle. Das bedeutet, dass TYL A nicht, wie bei SDZ und TMP vermutet, sorbierte oder in den Biofilm diffundierte. Die am letzten Versuchstag ermittelte relative Konzentration von TYL A betrug 96,6 % und war im Vergleich zur Kontrolle um drei Prozentpunkte geringer (99,7 %) (Abbildung 4.13 A). Im gleichen Zeitraum nahm der Gehalt des neuen Peaks stetig zu und betrug am letzten Versuchstag $0,7 \pm 0,1$ % (Abbildung 4.13 B). Die gleichzeitige Abnahme von TYL A mit der Zunahme des Peaks ließ auf ein Transformationsprodukt (TP) von TYL A vermuten. Auf dieses TP wird im Detail in Kapitel 4.5 eingegangen. Somit zeigte der Biofilm mit *P. fluorescens* mit TYL A eine andere Interaktion als mit SDZ und TMP.

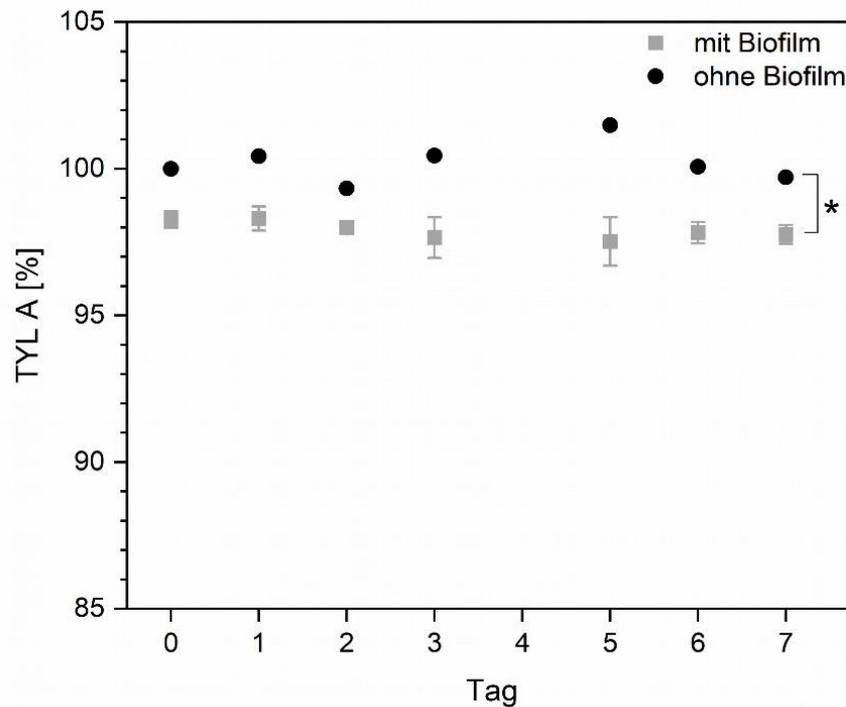


Abbildung 4.14: TYL-A-Ergebnisse des Modellbiofilms mit *P. aeruginosa*, alle Werte prozentual bezogen auf den Wirkstoffgehalt der abiotischen Kontrolle am Tag 0 (T0); abiotische Kontrolle wurde dabei nur einmal ausgeführt; * ANOVA $p < 0,005$ (Hahne et al., 2022).

Beim Modellbiofilm mit *P. aeruginosa* wurden andere Interaktionen nachgewiesen (Abbildung 4.14) (Hahne et al., 2022). Es konnte für TYL A in diesem Biofilm schon bei der ersten Probenahme ein geringerer Gehalt bestimmt werden (Abbildung 4.14). Die Konzentrationen blieben von Tag 0 an bis zum Versuchsende konstant auf ihrem jeweiligen Niveau. Es konnte kein neuer Peak in der überstehenden Biofilmrohrlösung detektiert werden. Darüber hinaus wurden keine weiteren visuellen Veränderungen in den UV-Chromatogrammen festgestellt. Daraus lässt sich bei diesem Biofilm für TYL A auf eine Diffusion oder Sorption wie bei SDZ und TMP schließen.

In Abhängigkeit von der Biofilmzusammensetzung konnten für TYL A zwei unterschiedliche Wechselwirkungsmechanismen nachgewiesen werden. Bei dem *P.-fluorescens*-Biofilm wurde der Gehalt an TYL A im Versuchszeitraum geringer und ein neuer Peak trat zur gleichen Zeit auf, dass auf eine Transformation schließen lässt. Mit dem Modellbiofilm mit *P. aeruginosa* konnte wie bei SDZ und TMP ein direkt nachweisbarer Konzentrationsunterschied in der ersten Probenahme bestimmt werden, sodass hier eine Sorption oder Diffusion vermutet wurde.

4.4.3 Einfluss der Veterinärantibiotika auf den Modellbiofilm

4.4.3.1 Mikrobiologischer Einfluss von SDZ und TMP

Sulfadiazin und Trimethoprim sind Antibiotika, die gegen gramnegative Zellen wirken und somit auch gegen das im Modellbiofilm verwendete Bakterium *E. coli*. Pseudomonaden besitzen eine

intrinsische Resistenz (Kapitel 3.4), weshalb hier kein Einfluss auf die koloniebildenden Einheiten (KbE) erwartet wurde (Breidenstein *et al.*, 2011; Hancock, 1998).

4.4.3.1.1 Einfluss auf die Biofilmdichte und -zusammensetzung

Zur Auswertung der mikrobiologischen Zusammensetzung wurde der Startwert der KbE aus Kapitel 0 des 7-tägigen Biofilms herangezogen (Rohrname T0). Nach dem Versuchszeitraum mit Antibiotikakonfrontation wurden die KbE in dem Rohr mit Antibiotika (Rohrname: mit AB) und in der biotischen Kontrolle (Rohr mit Biofilm ohne Antibiotika, Rohrname: ohne AB) ermittelt und verglichen (Abbildung 4.15).

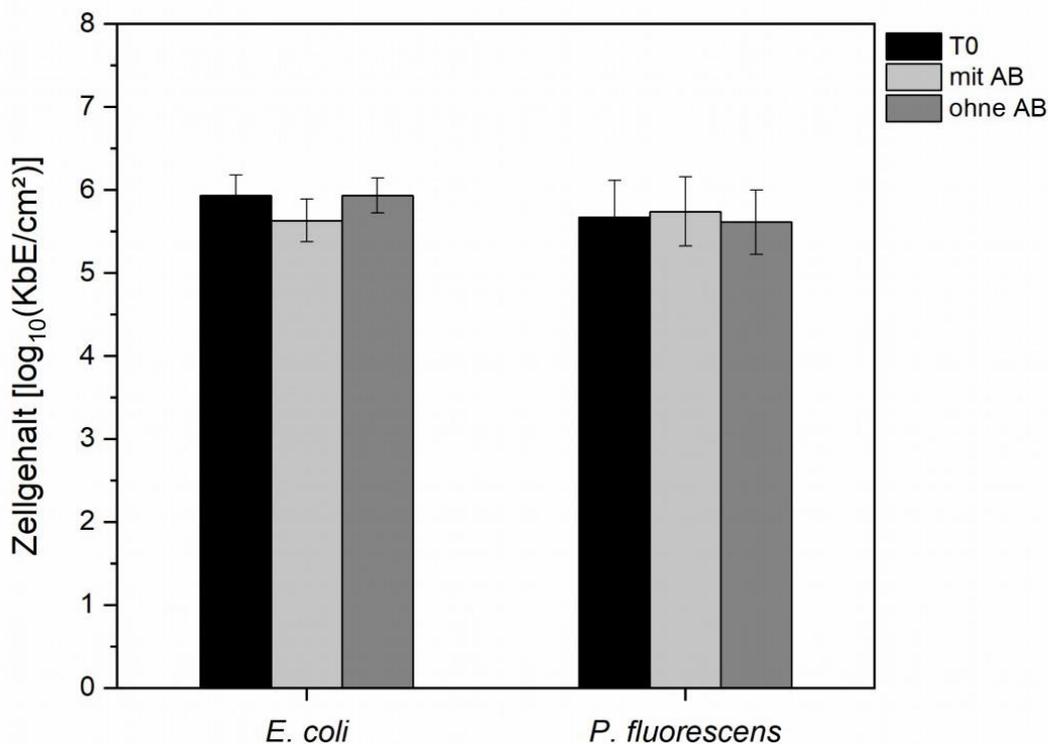


Abbildung 4.15: Zellgehaltszusammensetzung von *E. coli* und *P. fluorescens* vor der Konfrontation (Tag 0) und nach 7-tägiger Konfrontation mit den Antibiotika SDZ und TMP sowie der biotischen Kontrolle ohne Antibiotika; ANOVA: *E. coli*: $p = 0,17$; *P. fluorescens*: $p = 0,91$.

Die Zellgehalte an *E. coli* und *P. fluorescens* unterschieden sich nicht signifikant vom konfrontierten und nicht konfrontiertem Biofilmrohr und ebenso auch nicht von den Ausgangszellgehalten (Abbildung 4.14). Die Biofilmdichte und -zusammensetzung blieb in allen Rohren auf einem ähnlichen Niveau.

Eine andere Vorgehensweise zum Vergleich von behandelten und unbehandelten Biofilmen ist die logarithmische Reduzierung (log reduction, LR) und der prozentuale Anteil der abgestorbenen Zellen (percentage killed, PK) (Hamilton, 2010). Beide Kennzahlen (siehe experimenteller Teil 5.5.2) wurden am Center for Biofilm Engineering der Montana State University für die Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln gegenüber Biofilmen entwickelt und können auch für

Antibiotika angewendet werden (Hamilton, 2010). Sie werden als Hilfsmittel eingesetzt, um die Effektivität zur Biofilmentfernung zu quantifizieren. Dabei gibt LR die Differenz der logarithmischen Zellzahlen der behandelten von der unbehandelten Probe an. Ein Wert größer 0 zeigt eine Reduktion in der behandelten im Vergleich zur unbehandelten Probe auf. Der Anteil der PK vergleicht ebenfalls die behandelte mit der unbehandelten Probe nach der Konfrontation und zeigt als positive Zahl den prozentualen Anteil der abgestorbenen Zellen an.

Tabelle 4.15: Logarithmische Reduzierung (LR) und prozentualer Anteil der abgestorbenen Zellen (PK) für den Modellbiofilm nach Konfrontation mit SDZ und TMP nach Hamilton (2010).

Stamm	Log-Reduktion (LR)	PK [%]
<i>E. coli</i>	0,30 ± 0,17	50,0
<i>P. fluorescens</i>	-0,13 ± 0,28	-34,2

Für *P. fluorescens* konnte keine Abnahme in der LR nachgewiesen werden und auch PK zeigte ein negatives Ergebnis an (Tabelle 4.15). Im Mittel schien der Anteil an *P. fluorescens* im Biofilm sich somit zu erhöhen. Durch die Standardabweichung ist jedoch erkennbar, dass es in Einzelversuchen auch Werte gab, die ein positives Ergebnis in LR und PK erhielten und demnach eine leichte Verringerung nachwiesen. Eine eindeutige Tendenz konnte für einen Einfluss von SDZ und TMP auf *P. fluorescens* im Biofilm nicht geschlussfolgert werden. Dagegen wurde bei *E. coli* im Mittel eine PK von 50 % ermittelt. Das heißt, dass im Vergleich zur unbehandelten Probe in der Antibiotika-konfrontierten Probe 50 % weniger kulturvierbare Zellen nachgewiesen werden konnten. Bei der LR-Auswertung wird für die Effektivität von Desinfektionsmitteln zur Biofilmentfernung von einer relevanten Verringerung gesprochen, wenn sich LR um mindestens eine logarithmische Stufe verringert. Diese deutliche Verringerung konnte für beide Stämme nicht bestimmt werden. Somit konnte ein möglicherweise nur geringer Einfluss auf die Biofilmdichte und -zusammensetzung durch die Reduzierung an *E. coli* durch SDZ und TMP konnte durch die Verwendung der LR nachgewiesen werden.

Auch bei den KBE-Ergebnissen des Projektpartners für den *P.-aeruginosa*-Biofilm gab es für beide Stämme keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Rohren (Abbildung 4.16) (Hahne *et al.*, 2022). Es fallen vor allem die unterschiedlichen Anfangszellgehalte im Biofilm zwischen den beiden Stämmen des Versuches auf (Kapitel 0).

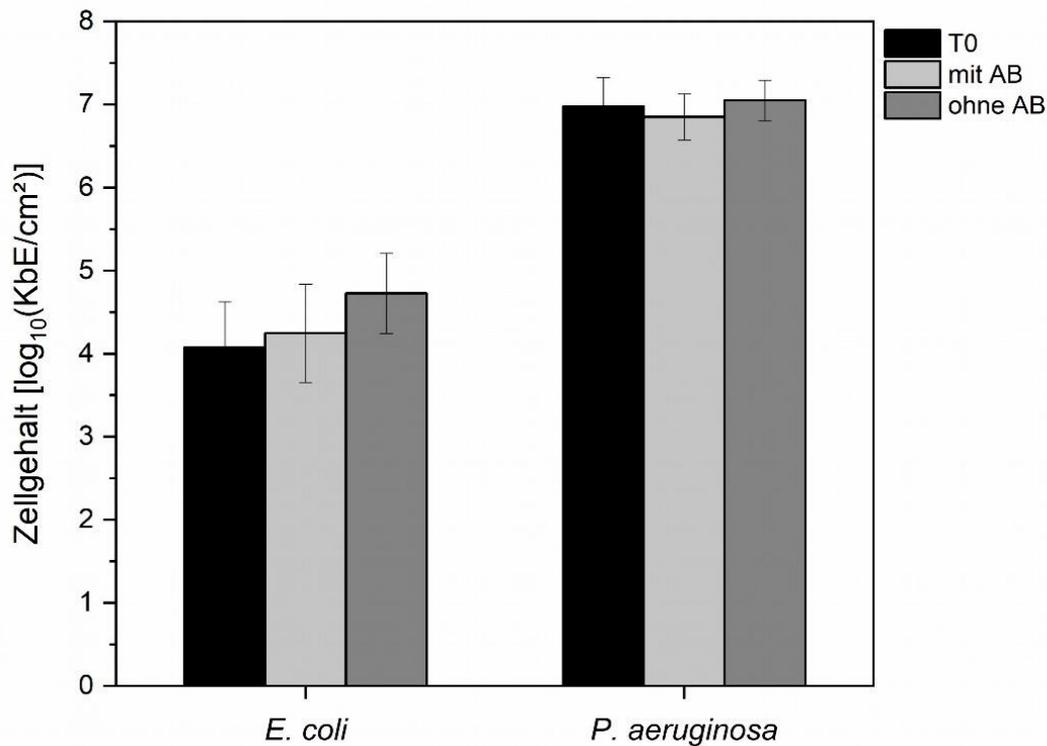


Abbildung 4.16: Zellgehaltszusammensetzung von *E. coli* und *P. aeruginosa* vor der Konfrontation (Tag 0) und nach 5-tägiger Konfrontation mit Antibiotika sowie der biotischen Kontrolle ohne Antibiotika (Hahne *et al.*, 2022); ANOVA: *E. coli*: $p = 0,20$; *P. aeruginosa*: $p = 0,55$.

Bei dem Vergleich der LR und PK des *P.-aeruginosa*-Modellbiofilms sind die Kennzahlen für *E. coli* geringer als beim Biofilm mit *P. fluorescens* (Tabelle 4.16). Dagegen zeigt *P. aeruginosa* eine durchschnittlich höhere Reduzierung an.

Tabelle 4.16: Logarithmische Reduzierung (LR) und prozentualer Anteil der abgestorbenen Zellen (PK) für den Biofilm mit *P. aeruginosa* nach Konfrontation mit SDZ und TMP, nach (Hamilton, 2010).

Stamm	Log-Reduktion (LR)	PK [%]
<i>E. coli</i>	$0,20 \pm 0,17$	36,8
<i>P. aeruginosa</i>	$0,48 \pm 0,34$	66,8

Bei beiden Modellbiofilmen konnten durch die AB-Konfrontation für beide Stämme keine signifikante Tendenz bezüglich einer Ab- oder Zunahme der KbE im Vergleich zum Tag 0 nachgewiesen werden (Vergleich hierzu Kapitel 0). Bei der Betrachtung der logarithmischen Reduzierung zwischen dem Rohr mit und ohne AB wies der *P.-fluorescens*-Modellbiofilm nur für *E. coli* eine geringe, nicht signifikante Abnahme der KbE auf. Beim Biofilm mit *P. aeruginosa* verzeichneten beide Stämme (*E. coli* und *P. aeruginosa*) einen geringeren KbE-Gehalt in der konfrontierten Probe im Vergleich zur biotischen Kontrolle. Somit unterscheiden sich die beiden

Modellbiofilme in Bezug auf die KbE-Reduzierung durch die AB-Konfrontation nur geringfügig. Eine relevante Änderung der Biofilmdichte oder -zusammensetzung konnte nicht festgestellt werden.

4.4.3.1.2 Einfluss auf die planktonischen Zellen

An den Versuchstagen 1 und 7 nach der Konfrontation wurden zusätzlich die planktonischen KbE in den Rohrlösungen bestimmt. Am Tag 0 konnte kein Zellgehalt in der Rohrlösung bestimmt werden, da an diesem Tag die Lösung frisch ausgetauscht wurde und demnach noch keine zu bestimmenden Zellen in der Lösung vorlagen.

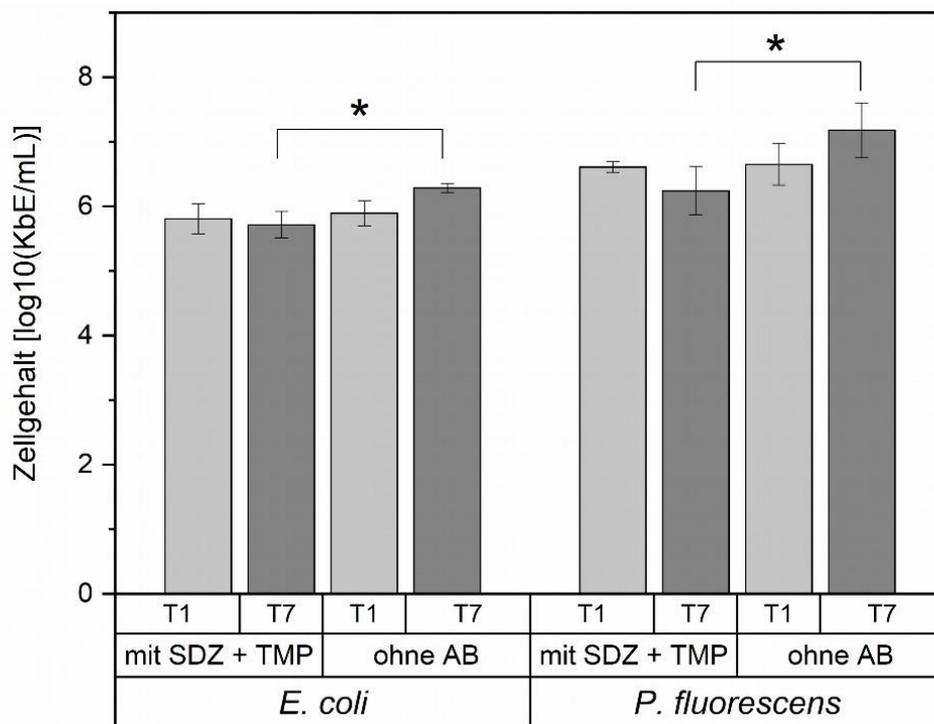


Abbildung 4.17: Zellgehalte der planktonischen Zellen von *E. coli* und *P. fluorescens* in den Biofilmrohren mit SDZ und TMP und ohne Antibiotika (AB) am Versuchstag 1 (T1) und 7 (T7); * ANOVA $p < 0,05$.

Am ersten Versuchstag unterschieden sich die Zellgehalte von *E. coli* und *P. fluorescens* mit und ohne AB nicht (Abbildung 4.17). Dagegen konnten am letzten Versuchstag für beide Rohre Unterschiede festgestellt werden. In den Biofilmrohren mit AB waren weniger KbE an *E. coli* und *P. fluorescens* als in den Rohren ohne AB. Der Einfluss auf *E. coli* ist nicht unerwartet, da der Stamm sensitiv gegenüber den verwendeten Wirkstoffen ist. Dass ein geringerer Gehalt von *P. fluorescens* nachgewiesen werden konnte, war zunächst überraschend, da Pseudomonaden als intrinsisch resistent gegenüber Sulfonamiden und Trimethoprim beschrieben wurden (Huovinen, 1987). Ursache für die Resistenz der Pseudomonaden ist unter anderem die niedrige Membranpermeabilität und das Vorhandensein von Effluxpumpen, die eine Rolle bei der Wirksamkeit von Antibiotika gegenüber Bakterien spielen und konzentrationsabhängig arbeiten (Köhler *et al.*,

1996). Die Datenlage zu minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) für Pseudomonaden ist gering (European Committee on Antimicrobial Susceptibility (EUCAST)). Für einen Wildtyp von *P. aeruginosa* wurden vergleichsweise hohe Konzentrationen bestimmt: 100 mg/L Trimethoprim und 125 mg/L Sulfamethoxazol (Köhler *et al.*, 1996). Dies bedeutet, dass eine antibiotische Wirkung trotz intrinsischer Resistenz bei hohen Antibiotikakonzentrationen detektiert werden kann. Im Vergleich dazu war die im Versuch verwendete SDZ-Konzentration (150 mg/L) höher und die TMP-Konzentration (30 mg/L) geringer. Somit wäre eine antibiotische Wirkung auf *P. fluorescens* zumindest nicht auszuschließen.

4.4.3.2 Mikrobiologischer Einfluss von Tylosin A

4.4.3.2.1 Einfluss auf die Biofilmdichte und -zusammensetzung

Die Zellgehalte von *E. coli* und *P. fluorescens* waren vor der TYL-A-Konfrontation zu gleichen Anteilen im Biofilm enthalten (Abbildung 4.18).

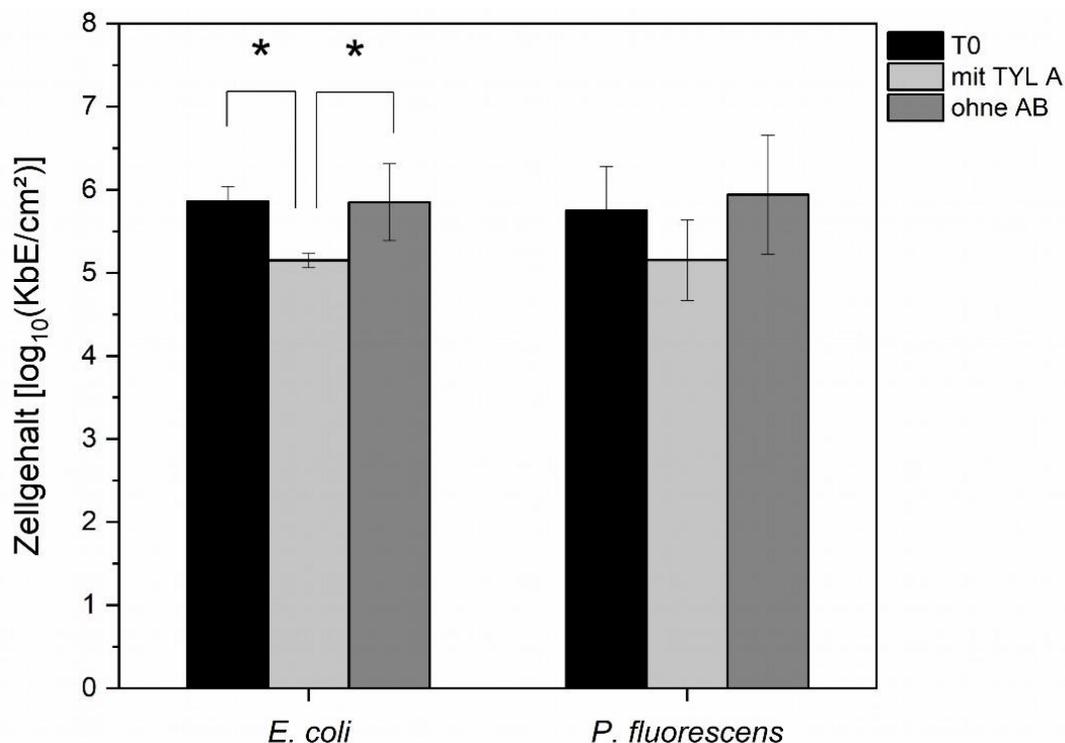


Abbildung 4.18: Zellgehaltszusammensetzung von *E. coli* und *P. fluorescens* vor der Konfrontation (Tag 0) und nach 7-tägiger Konfrontation mit TYL A sowie der biotischen Kontrolle ohne Antibiotika; * ANOVA: *E. coli*: $p < 0,05$, *P. fluorescens*: $p = 0,19$.

Während sich die Zellgehalte ohne AB-Konfrontation für beide Stämme über den Versuchszeitraum kaum veränderten, erfolgte bei TYL-A-Konfrontation ein deutlicher Rückgang der Zellgehalte. Dabei war die Abnahme der Zellgehalte von *E. coli* durch die TYL-A-Konfrontation signifikant. Bei *P. fluorescens* konnte keine Signifikanz zwischen den Zellgehalten nachgewiesen werden. Die Auswertung über die Veränderung der Zellgehalte erfolgte auch hier über die

logarithmische Reduzierung und als der prozentuale Anteil der abgestorbenen Zellen (PK) (Tabelle 4.17, Vergleich Kapitel 4.4.3.1.1).

Tabelle 4.17: Logarithmische Reduzierung (LR) und prozentualer Anteil der abgestorbenen Zellen (PK) für den *P.-fluorescens*-Modellbiofilm nach Konfrontation mit TYL A, nach (Hamilton, 2010).

Stamm	LR	PK [%]
<i>E. coli</i>	0,70 ± 0,24	80,2
<i>P. fluorescens</i>	0,79 ± 0,43	83,7

Es konnte für beide Stämme im *P.-fluorescens*-Biofilm eine positive LR und PK nachgewiesen werden. Somit sind die Zellgehalte im Biofilm nach Konfrontation mit TYL A in jedem Versuch geringer als in der Kontrolle. Mit der LR- und PK-Auswertung konnte eine wachstumshemmende Auswirkung auf den Biofilm bestätigt werden.

Beim Modellbiofilm mit *P. aeruginosa* zeigte sich ein anderes Bild. Bei den Ausgangsbedingungen war *P. aeruginosa* zu deutlich höheren Anteilen vertreten als *E. coli* (Abbildung 4.19) (Hahne *et al.*, 2022).

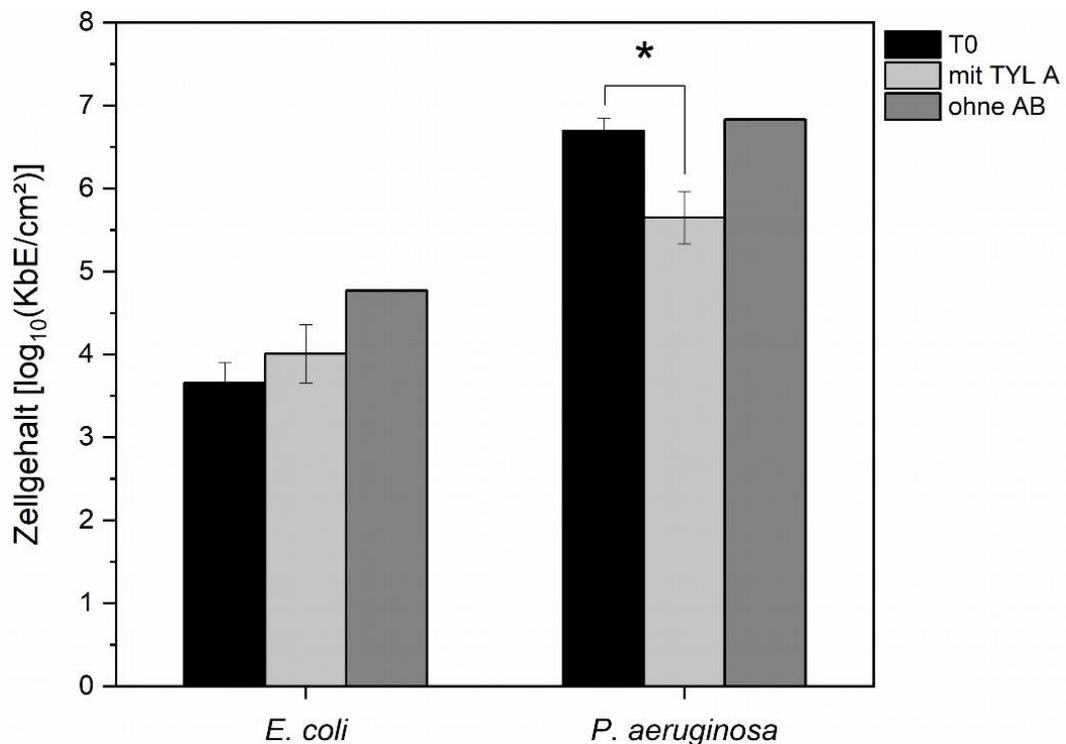


Abbildung 4.19: Zellgehaltszusammensetzung von *E. coli* und *P. aeruginosa* vor der Konfrontation (Tag 0) und nach 5-tägiger Konfrontation mit TYL A sowie der biotischen Kontrolle; der Versuchsansatz ohne AB wurde nur einmal durchgeführt (Hahne *et al.*, 2022); * *t*-Test für *P. aeruginosa* von „mit TYL A“ zu „T0“ $p < 0,005$.

In diesem Modellbiofilm konnte ein Einfluss von TYL A auf die Zellgehalte von *P. aeruginosa* eindeutig gezeigt werden. Im Rohr mit TYL A ist der ermittelte Zellgehalt des *P. aeruginosa* im Biofilm deutlich geringer als in dem biotischen Kontrollrohr, in dem sich der Zellgehalt im Vergleich zu den Anfangsbedingungen kaum veränderte. Die Anzahl der *E. coli* stieg in beiden Röhren an, wobei diese im Rohr ohne TYL A um eine logarithmische Stufe höher war. Die Betrachtung der LR und PK zeigte für *P. aeruginosa* eine deutlich höhere Reduzierung an (Tabelle 4.18). Bei einer LR größer 1 geht man bei Desinfektionsmitteln von einer relevanten Verringerung aus (Kapitel 4.4.3.1.1)(Hamilton, 2010). Für *E. coli* ergibt sich eine ähnliche Reduzierung wie beim Biofilm mit *P. fluorescens*.

Tabelle 4.18: Logarithmische Reduzierung (LR) und prozentualer Anteil der abgestorbenen Zellen (PK) für den Biofilm mit *P. aeruginosa* nach Konfrontation mit TYL A, nach (Hamilton, 2010).

Stamm	Log-Reduktion (LR)	PK [%]
<i>E. coli</i>	0,76 ± 0,35	82,7
<i>P. aeruginosa</i>	1,18 ± 0,32	93,4

Somit konnte für beide Modellbiofilme ein Effekt auf die Zellgehalte durch TYL A nachgewiesen werden. Die Biofilmdichte verringerte sich durch die Konfrontation mit TYL A im Vergleich zur biotischen Kontrolle und zum Ausgangsgehalt. Durch die höhere Reduzierung der Zellgehalte von *P. aeruginosa* und *P. fluorescens* veränderte sich auch die Biofilmzusammensetzung der Anteile der Stämme in beiden Modellbiofilmen.

4.4.3.2.2 Einfluss auf die planktonischen Zellen

Auch bei den Biofilmversuchen mit TYL A wurden die Zellgehalte in den planktonischen Rohrlösungen untersucht. Da die Zellgehalte im Biofilm sich unerwarteterweise durch die TYL-A-Konfrontation unterschieden, wurde bei den planktonischen Zellgehalten nahezu täglich eine Probe entnommen.

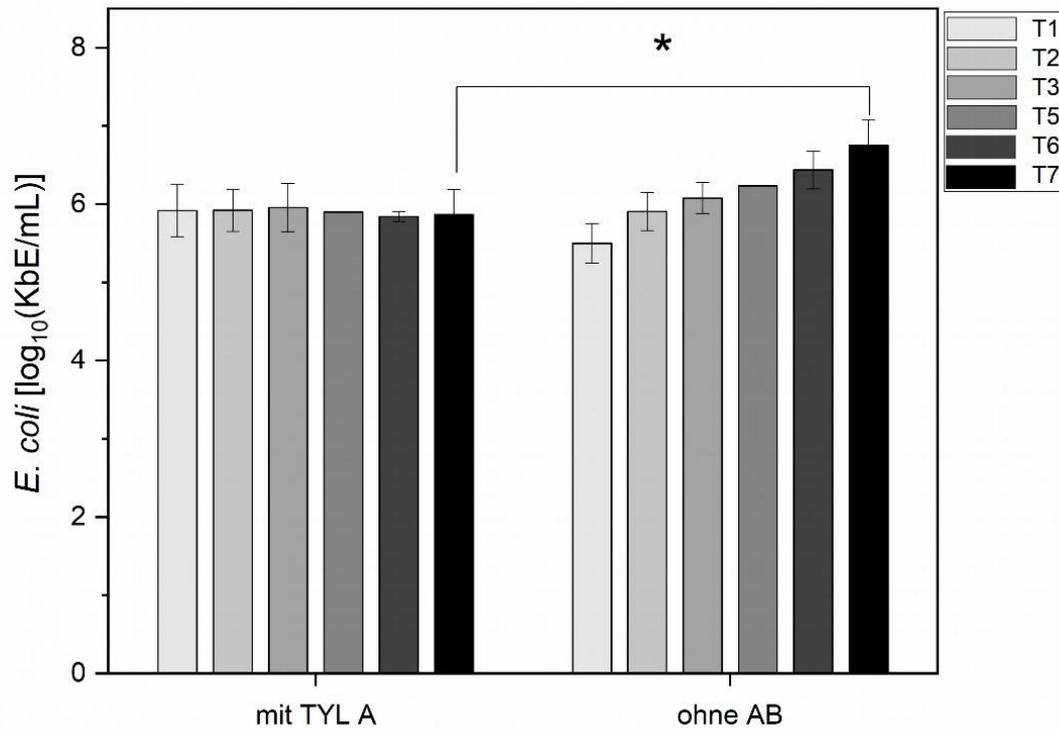


Abbildung 4.20: Planktonische Zellgehalte von *E. coli* in den Biofilmrohren mit TYL A und ohne AB zu den Versuchstagen 1, 2, 3, 5, 6 und 7. Versuchstag 5 wurde nur in einem Versuch mit doppeltem Ausstrich durchgeführt; * ANOVA $p < 0,05$.

Im Biofilmrohr mit TYL A blieb der Gehalt von *E. coli* über den Versuchszeitraum auf dem gleichen Niveau (Abbildung 4.20). Ohne TYL A fand hingegen ein Wachstum statt. Der Zellgehalt an *E. coli* mit TYL A unterschied sich signifikant ($p < 0,05$) von dem höheren Zellgehalt ohne TYL A.

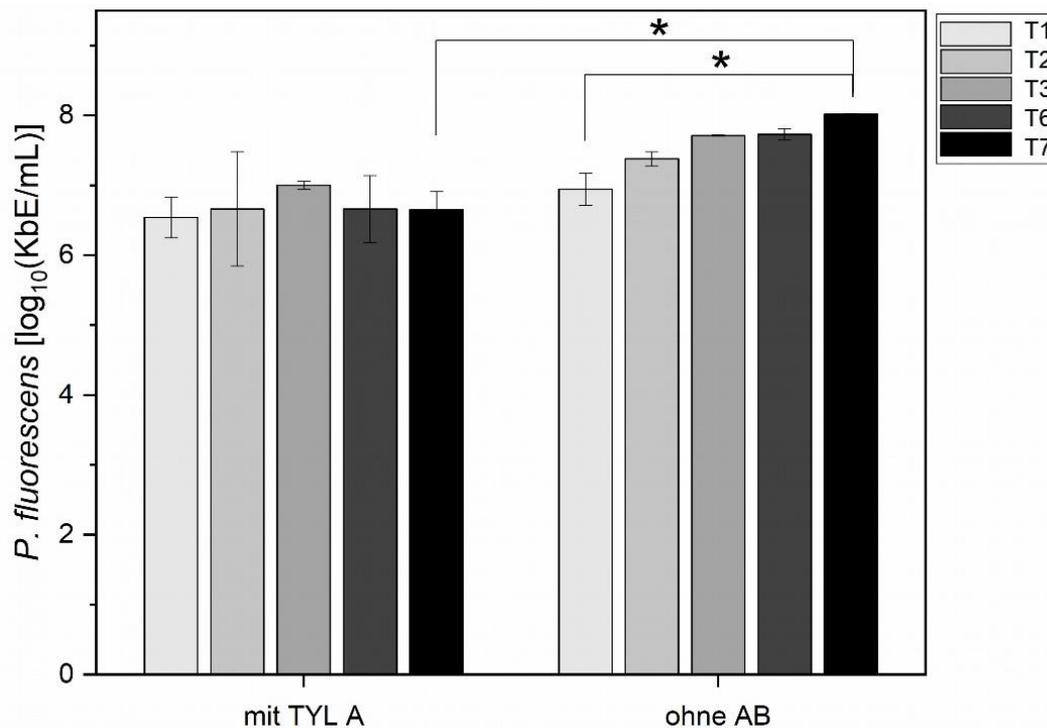


Abbildung 4.21: Planktonische Zellgehalte von *P. fluorescens* in den Biofilmrohren mit TYL A und ohne AB an den Versuchstagen 1, 2, 3, 6 und 7; * ANOVA $p < 0,05$.

In der Bakteriensuspension blieben die planktonischen Zellgehalte von *P. fluorescens* während der TYL-A-Konfrontation auf gleichem Niveau (Abbildung 4.21). Im Vergleich dazu war ohne TYL A eine signifikante Steigerung der Gehalte zu erkennen. Der ermittelte Gehalt am letzten Versuchstag ohne TYL A unterschied sich vom ersten Versuchstag sowie auch vom letzten Versuchstag mit TYL A.

Somit hat das Makrolid TYL A, das normalerweise gegen grampositive Stämme wirkt (Kapitel 3.2.2), unerwarteterweise einen Einfluss auf die Zellgehalte der gramnegativen Stämme *E. coli* und *P. fluorescens* im Biofilm sowie auf die Gehalte in der planktonischen Lösung. In den Datenbanken gibt es für diese Spezies keine MHK-Werte für TYL A (EUCAST).

4.4.3.3 Antibiotikaresistenzermittlung von *E. coli* aus dem Biofilm

Eine Resistenzentwicklung von Bakterien kann durch Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) und Vergleich zu Bezugswerten bestimmt werden. Die $MHK_{50/90}$ gibt die AB-Konzentration an, die 50 % oder 90 % des untersuchten Stammes *in vitro* inhibiert. Die Bestimmung kann dabei über eine Verdünnungsreihe oder Ausmessen von Hemmhöfen erfolgen (Fritsche, 2016). Dabei werden verschiedene Antibiotikaklassen getestet, um Kreuzresistenzen zu ermitteln. Nimmt die Resistenz eines Stammes zu, steigt die MHK. Zur Beurteilung der MHK werden die epidemiologischen Cut-Off-Werte (ECOFF-Werte) herangezogen (Löscher *et al.*, 2014). Dieser ist der Grenzwert zwischen Wildtyp- und Nicht-Wildtyppopulation. In der Nicht-Wildtyppopulation werden Bakterien mit höheren MHK-Werten zusammengefasst, die

zusätzliche Resistenzmechanismen erworben haben. Der Wildtyp umfasst die natürliche Population mit den niedrigsten MHK-Werten. Durch den Vergleich der ermittelten MHK-Werte mit den ECOFF-Werten aus der EUCAST-Datenbank können Verschiebungen erkannt und Hinweise auf Resistenzentwicklungen innerhalb einer Bakterienpopulation gewonnen werden (Löscher *et al.*, 2014).

Zur Ermittlung der Resistenzentwicklung von *E. coli* wurden von jedem Biofilmrohr Isolate entnommen und vom Projektpartner aus Hannover auf eine Veränderung ihrer minimalen Hemmkonzentration (MHK) untersucht (Tabelle 4.19) (Hahne *et al.*, 2022). Dabei sind beide Modellbiofilme und die Konfrontationen beider Wirkstoffkombinationen (SDZ/TMP und TYL A) zusammengefasst, da keine Unterschiede festgestellt wurden.

Tabelle 4.19: Resistenzermittlung von Biofilm-*E. coli*-Isolaten (n = 20) nach AB-Konfrontation (SDZ/TMP und TYL A) mittels MHK₅₀ und MHK₉₀, aufgeführt sind getestete Antibiotika und die untersuchten Konzentrationsbereiche sowie die Referenzkonzentrationen ECOFF (Hahne *et al.*, 2022).

Antibiotikum	Konzentrationsbereich [mg/L]	ECOFF ^a [mg/L]	MHK ₅₀ [mg/L]	MHK ₉₀ [mg/L]
Ampicillin	0,25 – 32	≤ 8	4	4
Cefotaxim	0,06 – 8	≤ 0,25	≤ 0,06	≤ 0,06
Ceftazidim	0,06 – 8	≤ 0,5	0,25	0,5
Chloramphenicol	2 – 128	≤ 16	8	8
Ciprofloxacin	0,015 – 2	≤ 0,06	≤ 0,03	≤ 0,03
Colistin	0,12 – 16	≤ 2	1	2
Gentamicin	0,25 – 16	≤ 2	1	2
Nalidixinsäure	1 – 128	≤ 16	4	8
Sulfisoxazol	2 – 256	-b	4	4
Tetrazyklin	0,25 – 32	≤ 8	2	2
TMP	0,25 – 32	≤ 2	≤ 0,25	≤ 0,25
TYL A	2 – 2048	-b	1024	1024
SDZ/TMP	0,59/0,03 – 76/4	≤ 19/1	≤ 0,59/0,03	≤ 0,59/0,03

a: ECOFF: epidemiologischer Cut-Off-Wert nach European Committee on Antimicrobial Susceptibility (EUCAST)

b: kein ECOFF-Wert nach EUCAST dokumentiert

Aus Tabelle 4.19 geht hervor, dass bei der Konfrontation der verschiedenen Wirkstoffe keine messbaren Unterschiede in den MHK der untersuchten *E.-coli*-Isolate der Versuche mit SDZ/TMP und TYL A ermittelt wurden und dass keine MHK über dem ECOFF-Wert lag. Ein Unterschied zwischen den MHK₅₀ und MHK₉₀-Werten zu den *E.-coli*-Isolaten vor der AB-Konfrontation konnte ebenfalls nicht bestimmt werden. Da die überlebenden *E.-coli*-Isolate nach Exposition weiterhin phänotypisch sensibel gegenüber SDZ/TMP sowie gegenüber einer Reihe anderer antibiotischer Substanzen waren, ist es wahrscheinlich, dass die beobachtete AB-Toleranz der sessilen *E.-coli*-Zellen spezifisch mit den Merkmalen des Biofilms zusammenhängt. Zahlreiche Studien belegen, dass Biofilm-Toleranzmechanismen hauptsächlich auf die Behinderung der Antibiotikapenetration durch die extrazelluläre Matrix und/oder auf die metabolische Aktivität von Zellsubpopulationen zurückzuführen sind (Flemming *et al.*, 2016). Dies könnte erklären, dass keine Veränderung der MHK nachgewiesen wurde.

4.4.4 Darstellungen der Modellbiofilme mittels MS-Imaging nach Antibiotika-konfrontation

Die Biofilm-Visualisierungen mittels MALDI-MS wurden nur mit dem *P.-fluorescens*-Modellbiofilm durchgeführt, da der Modellbiofilm mit *P. aeruginosa* in Hannover beim DBU-Projektpartner hergestellt wurde. Somit können hier keine Ergebnisse verglichen werden.

4.4.4.1 Darstellung von SDZ und TMP im Modellbiofilm mittels MALDI-MS

Die Darstellung des Modellbiofilms mittels MALDI-MSI durch ausgewählte Phospholipide und eine Dihexose wurde im Kapitel 4.3.3 aufgeführt. In diesem Kapitel wird der Einfluss von SDZ und TMP auf den Biofilm dargestellt. Aus Kapitel 4.4.2.1 ist bekannt, dass sich die Konzentrationen von SDZ und TMP bei der Biofilm-Konfrontation verringerten. Somit könnte eine Sorption bzw. Diffusion an bzw. in den Biofilm vorliegen. Mittels MALDI-MSI sollte überprüft werden, ob SDZ und TMP auf der Oberfläche detektierbar sind und wie deren Verteilung aussieht. Für diesen Versuch wurde ausschließlich eine große Lichtmikroskopaufnahme angefertigt (Abbildung 4.22). Ein direkter Vergleich zum MSI-Ausschnitt ist daher nichtmöglich.

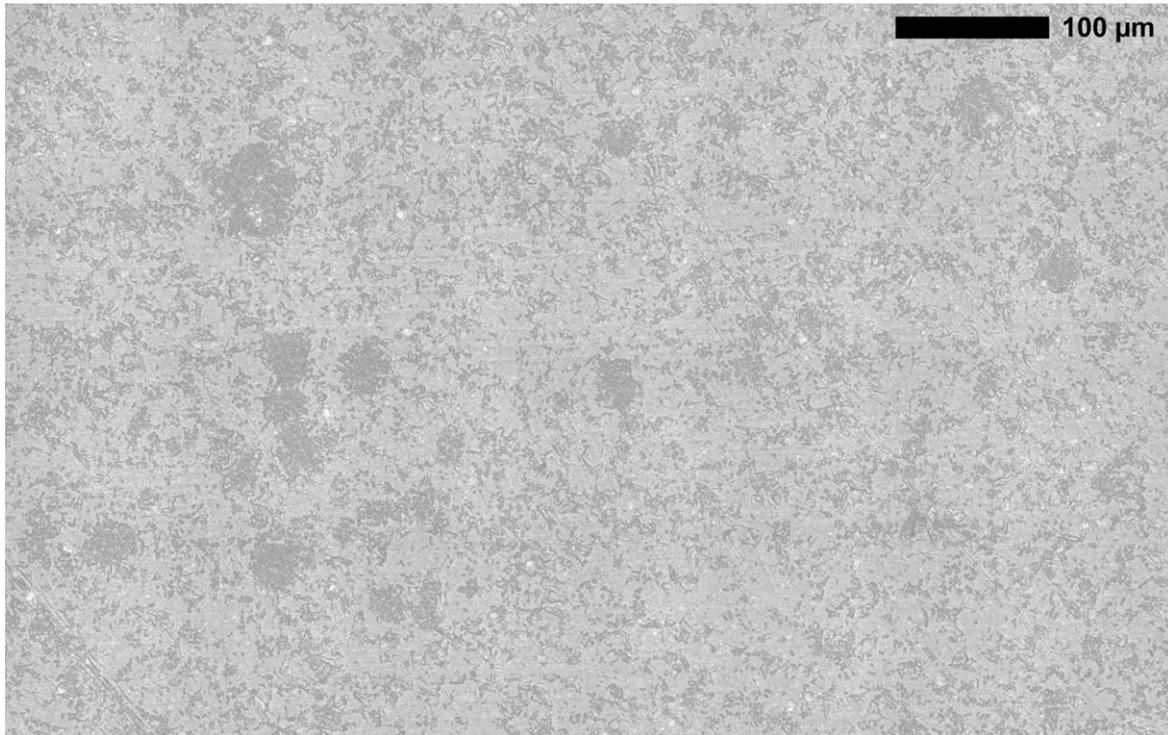


Abbildung 4.22: Mikroskopaufnahme eines mit Biofilm bewachsenen PVC-Coupon, Größenverhältnisse abgeschätzt: ca. $800 \times 500 \mu\text{m}^2$.

Auf dem in Abbildung 4.22 dargestellten PVC-Abschnitt sind anhaftende Zellen zu erkennen. Dabei sind sie nicht wie bei dem PVC-Abschnitt ohne AB-Konfrontation gleichmäßig verteilt, sondern bilden an einigen Stellen größere Zellansammlungen, an denen die Zellen in konzentrierter Form nebeneinander vorliegen (Vergleich Abbildung 4.4). Dass AB einen Effekt auf die Biofilmverteilung auf Oberflächen haben, konnten Chatterjee *et al.* (2014) für einen Biofilm aus *P. aeruginosa* nach Konfrontation mit Ciprofloxacin nachweisen. Hierbei war ebenfalls eine höhere Clusterbildung der Zellen zu erkennen.

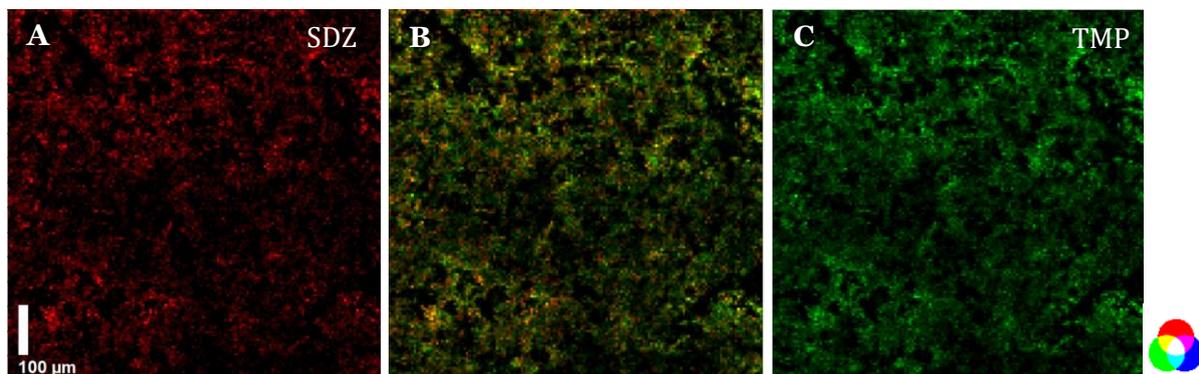


Abbildung 4.23: MALDI-MSI des Modellbiofilms mit SDZ und TMP (Aufnahmebereich $750 \times 750 \mu\text{m}^2$, aufgenommener Massenbereich der m/z -Verhältnisse von 200 – 800); **A**) MSI des m/z -Verhältnisses von 251,0990 für $[M+H]^+$ von SDZ (rot); **B**) Überlagerung der Ionenbilder von A und C; **C**) MSI des m/z -Verhältnisses von 291,1452 für $[M+H]^+$ von TMP (grün).

Während der bildgebenden MS-Messungen konnten SDZ und TMP als protonierte Addukte auf der PVC-Fläche detektiert werden (Abbildung 4.23 A und C). Dabei hat TMP eine höhere Intensität als SDZ, obwohl es relativ zu SDZ nur zu 20 % enthalten war. Dies könnte daran liegen, dass TMP zwei freie Amino-Gruppen zur Protonierung hat im Vergleich zu SDZ, das nur eine freie Amino-Gruppe besitzt (Abbildung 3.3). Die Gelbfärbung beim Übereinanderlegen der Signale zeigt, dass beide Antibiotika an den gleichen Stellen lokalisiert sind (Abbildung 4.23 B).

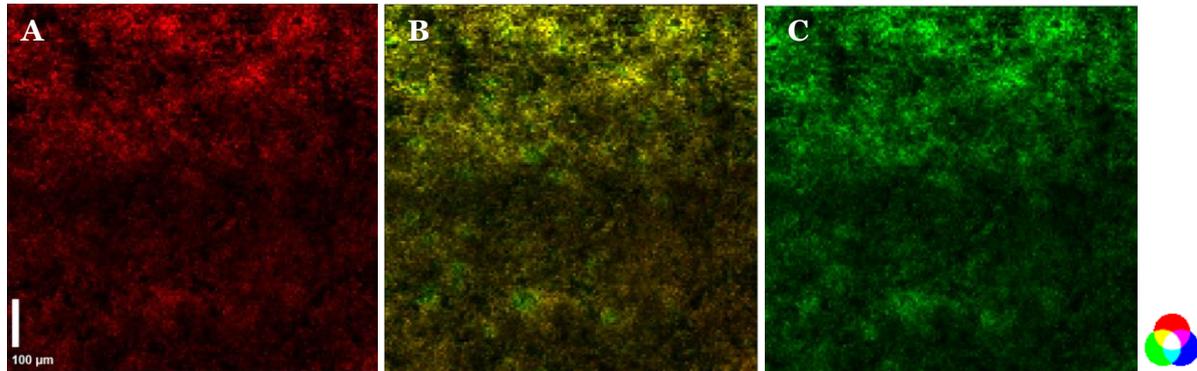


Abbildung 4.24: MALDI-MSI von Phospholipiden des Modellbiofilms mit SDZ und TMP (Aufnahmebereich $750 \times 750 \mu\text{m}^2$, aufgenommener Massenbereich der m/z -Verhältnisse von 200 – 800); **A**) MSI des m/z -Verhältnisses von 712,4887 (rot); **B**) Überlagerung der Ionenbilder von A und C; **C**) MSI des m/z -Verhältnisses von 726,5043 (grün).

Das Übereinanderlegen der MSI der beiden Phospholipide (m/z -Verhältnisse von 712,4887 und 726,5043) zeigt eine Gelbfärbung (Abbildung 4.24 B). Das bedeutet, dass die Phospholipide an gleichen Stellen lokalisiert sind. Dabei treten wenige grüne Stellen des m/z -Verhältnisses von 726,5043 hervor, sodass dieses Phospholipid in vergleichsweise höheren Intensitäten vorlag. Wie in Abbildung 4.7 konnte dies auch bei der Biofilmprobe ohne Antibiotikakontakt nachgewiesen werden. In Abbildung 4.25 werden nun beide betrachteten Phospholipide mit TMP in der RGB-Darstellung übereinandergelegt, um einen Zusammenhang zwischen der Lage von TMP und den Phospholipiden auf der Biofilmoberfläche zu prüfen.

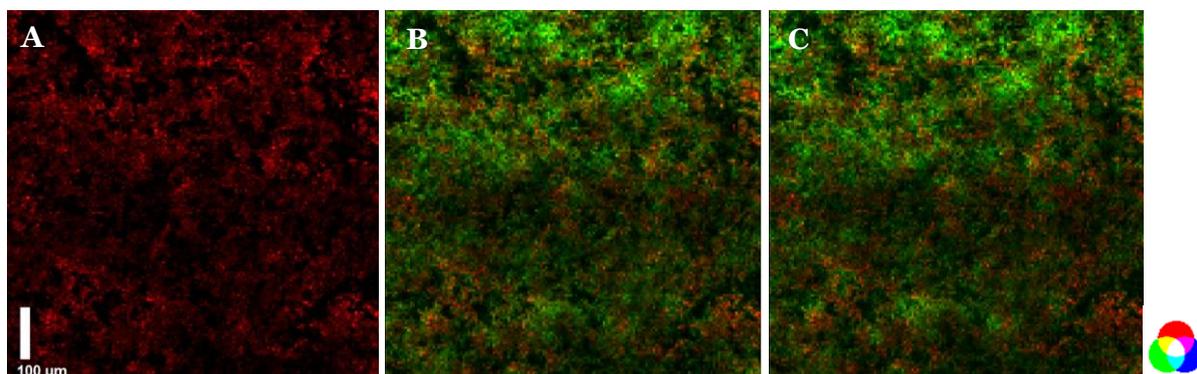


Abbildung 4.25: MALDI-MSI von TMP mit Phospholipiden des Modellbiofilms (Aufnahmebereich $750 \times 750 \mu\text{m}^2$, aufgenommener Massenbereich der m/z -Verhältnisse von 200 – 800); **A**) MSI von TMP (rot); **B**) MSI von TMP (A) und dem Phospholipid mit m/z -Verhältnis von 712,4887 (grün); **C**) MSI von TMP (A) und Phospholipid mit m/z -Verhältnis von 726,5043 (grün).

TMP konnte an den gleichen Stellen wie die untersuchten Phospholipide detektiert werden, was durch die Abschwächung der Rotfärbung in eine Orangefärbung des TMP deutlich wird (Abbildung 4.25 B und C). Dabei wurde TMP nicht an allen Phospholipid-Stellen detektiert. Dies könnte darauf hindeuten, dass an diesen Stellen TMP nicht sorbiert wurde, sondern andere Substanzen für eine Anhaftung verantwortlich wären. Auch könnten diese Stellen dichtere oder größere Zellansammlungen sein, dass durch die deutliche Hervorhebung der Grünfärbung der Phospholipide vermutet werden kann. Wenn TMP ins Innere dieser Zellansammlungen diffundierte, könnte es sein, dass mittels MALDI-MS nur die obere Fläche detektiert und somit diffundiertes TMP nicht mehr erfasst werden konnte. Bei der MALDI-MS-Analytik wird die Oberfläche durch den Ionisationsvorgang beschädigt und bis zu einer Tiefe von 5 bis 10 μm durchdrungen.

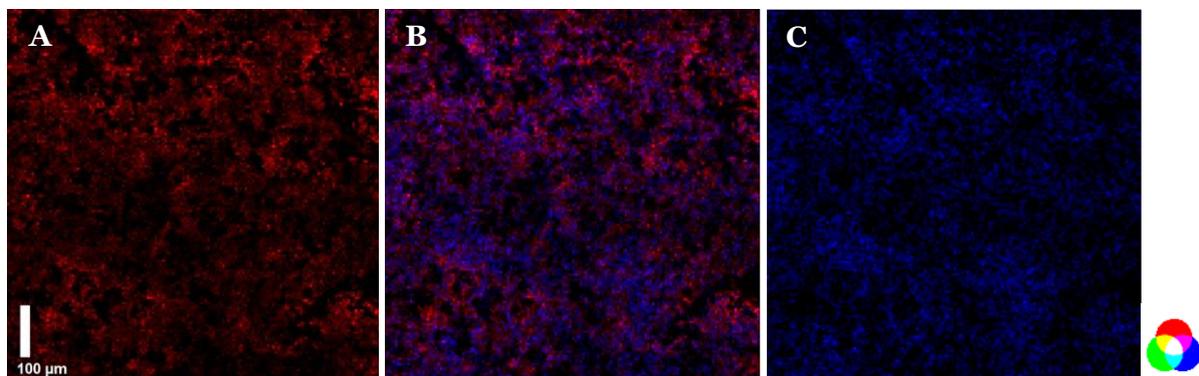


Abbildung 4.26: MALDI-MSI von Dihexose und TMP des Modellbiofilms (Aufnahmebereich $750 \times 750 \mu\text{m}^2$, aufgenommener Massenbereich der m/z -Verhältnisse von 200 – 800); **A**) MSI von TMP (rot); **B**) Überlagerung der Ionenbilder A und C; **C**) MSI des m/z -Verhältnisses von 365,1054 (blau, mit $[\text{M}+\text{Na}]^+$ einer Dihexose zugeordnet).

TMP wurde ebenfalls an den gleichen Stellen wie die Dihexose detektiert, was durch die Violett-färbung deutlich wird (Abbildung 4.26 B). Allerdings ist TMP nicht an allen Stellen zu sehen, an denen auch Dihexose lokalisiert ist. Dies bestärkt die Erklärung, dass die Verteilung von TMP mit der Kolokalisation der Phospholipide und somit mit den Zellansammlungen bzw. der Dichte des Biofilms auf der Fläche zusammenhängt.

In der Kontrollprobe eines PVC-Ausschnitts nach 7-tägiger Lagerung in Minimalmedium mit SDZ und TMP konnten beide AB auf dem Abschnitt mit ihren m/z -Verhältnissen nachgewiesen werden. Dabei wurden sie im Vergleich zu der Biofilmprobe in unterschiedlichen Intensitäten detektiert. SDZ und TMP wurden nicht an den gleichen Stellen detektiert und nicht in den Intensitätsverhältnissen, wie sie auf dem Biofilmcoupon nachgewiesen worden. Es wurde deshalb davon ausgegangen, dass die Probe nicht ausreichend gespült war und deshalb SDZ und TMP noch nachgewiesen werden konnten. Es zeigte sich, dass hierbei SDZ nur auf einer Teilfläche des Abschnitts detektiert werden konnte und somit nicht mit der PVC-Oberfläche interagiert. Somit ist der Nachweis der Wirkstoffe auf der Biofilmoberfläche durch den Biofilm zu erklären. Bei

einem Wiederholungsversuch kam es zu messtechnischen Problemen. Dadurch konnten die Ergebnisse dieses Versuchs nicht weiter abgesichert werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass SDZ und TMP auf dem Biofilm-PVC-Coupon mittels MALDI-MS detektiert werden können. Dabei waren die Phospholipide meist an den gleichen Stellen lokalisiert wie SDZ und TMP. An anderen Stellen mit hohen Phospholipid-Intensitäten waren TMP und SDZ hingegen nicht nachweisbar. Zunächst wurde vermutet, dass die Phospholipide nicht für das Zurückbleiben der AB verantwortlich waren. Die vermutete EPS-Markersubstanz zeigte keinen Zusammenhang zwischen ihren nachgewiesenen Stellen und denen der Wirkstoffe auf. Deshalb liegt die Erklärung näher, dass an den intensiven gefärbten Phospholipid-Stellen nur die Oberfläche des Biofilms detektiert wurde und TMP und SDZ in tieferen Schichten lokalisiert waren. Um spezifischere Aussagen zu treffen, müsste das Experiment wiederholt und modifiziert werden. Die Messung eines Querschnitts wäre sicherlich sinnvoll, aber experimentell schwierig zu realisieren.

4.4.4.2 Darstellung von TYL A im Modellbiofilm mittels MALDI-MS

Die Verteilung von TYL A im Biofilm sollte durch einen Vergleich mit den darin enthaltenen Phospholipiden und der Dihexose durch MALDI-MSI dargestellt werden (Vergleich hierzu Kapitel 4.4.4.1 für SDZ und TMP). Für die MALDI-MS-Messung wurde die m/z -Datenaufnahme auf den Bereich mit TYL A angepasst (m/z -Verhältnisse von 250 – 1000). Zum Vergleich wurde eine Lichtmikroskopaufnahme angefertigt, die den gleichen Bereich wie das MSI zeigt (Abbildung 4.27 A).

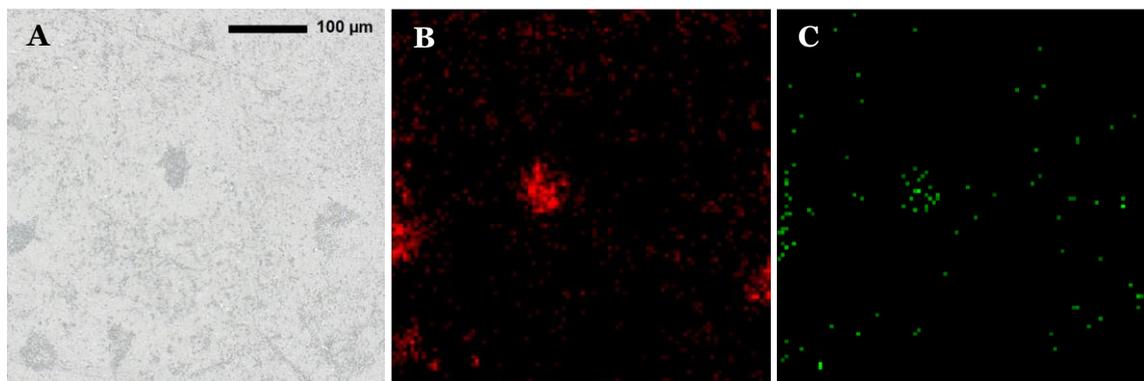


Abbildung 4.27: **A)** optisches Bild des MALDI-MSI-Ausschnitts (Aufnahmebereich $500 \times 500 \mu\text{m}^2$); **B)** MSI des m/z -Verhältnisses von 916,5259 für $[M+H]^+$ von TYL A (rot), **C)** MSI von TYL B (grün, m/z -Verhältnis von 772,4476); aufgenommener Massenbereich der m/z -Verhältnisse von 250 – 1000).

TYL A konnte als protoniertes Addukt gut dargestellt werden. Das Antibiotikum ist dabei nicht gleich verteilt, sondern auf wenige Stellen konzentriert (Abbildung 4.27 B). Auf der umliegenden Fläche ist TYL A in geringeren Intensitäten verteilt. Tylosin B (TYL B), der zu 5 % im TYL-A-Standard enthalten ist, wird insbesondere an den Stellen detektiert, an denen TYL A lokalisiert ist (Abbildung 4.27 C). TYL B ist nur mit schwacher Intensität zu sehen, weshalb auf eine weitere

Darstellung mit TYL B verzichtet wurde. Im Vergleich mit der Lichtmikroskopaufnahme zeigt sich, dass die hohen Intensitäten von TYL A im Bereich der Zellansammlungen detektiert werden. In Abbildung 4.28 sind die Phospholipide (m/z -Verhältnisse von 712,4887 und 726,5043) und TYL A in der RGB-Darstellung übereinandergelegt.

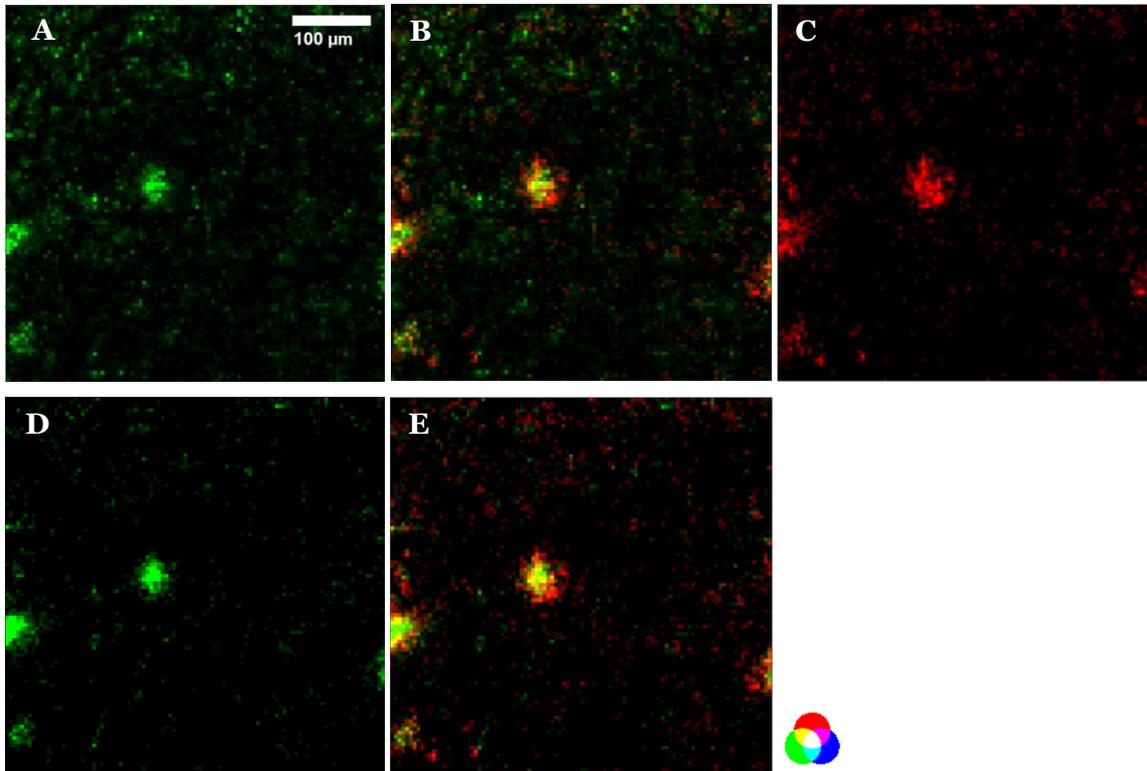


Abbildung 4.28: MALDI-MSI von Phospholipiden des Modellbiofilms mit TYL A (Aufnahmebereich $500 \times 500 \mu\text{m}^2$, aufgenommener Massenbereich der m/z -Verhältnisse von 250 – 1000); **A**) MSI des Phospholipids mit m/z -Verhältnis von 712,4887 (grün); **B**) Überlagerung der Ionenbilder von A und C; **C**) MSI von TYL A (rot) mit m/z -Verhältnis von 916,5259; **D**) MSI des Phospholipids mit dem m/z -Verhältnis von 726,5043 (grün); **E**) Überlagerung der Ionenbilder von C und D.

Die Phospholipide mit TYL-A-Konfrontation sind im Vergleich zu dem Modellbiofilm mit SDZ und TMP und zum Kontrollbiofilm nicht so dicht und flächendeckend verteilt. Bei SDZ und TMP konnten die Phospholipide fast über die ganze Fläche in unterschiedlichen Intensitäten mit einigen Hotspots detektiert werden (Vergleich Abbildung 4.24). Bei der Konfrontation mit TYL A sind in dem Ausschnitt vier Hotspots erkennbar und einzelne Spots weniger flächendeckend. Die MSI-Aufnahmen von TYL A mit den Phospholipiden zeigen, dass TYL A genau an diesen Hotspots lokalisiert ist.

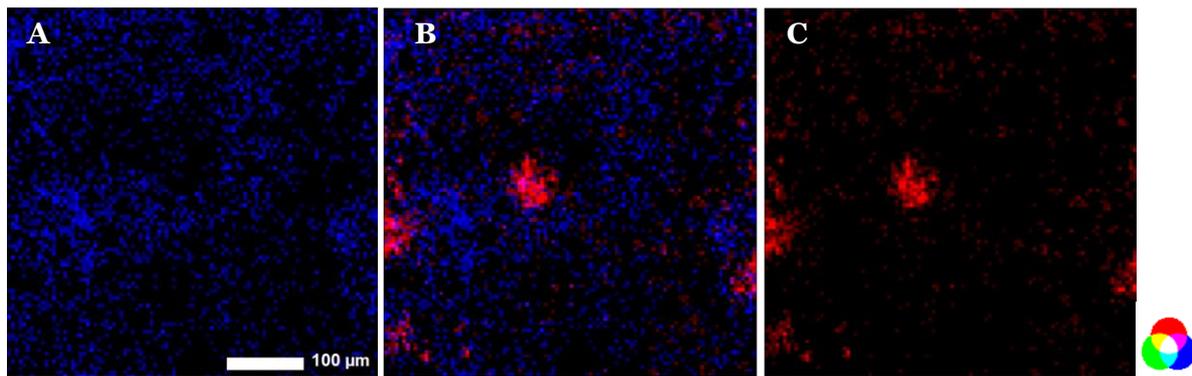


Abbildung 4.29: MALDI-MSI von TYL A und der Dihexose des Modellbiofilms (Aufnahmebereich $500 \times 500 \mu\text{m}^2$, aufgenommener Massenbereich der m/z -Verhältnisse von 250 – 1000); **A**) MSI des m/z -Verhältnisses von 365,1054 (blau, mit $[M+Na]^+$ einer Dihexose zugeordnet); **B**) Überlagerung der Ionenbilder von A und C; **C**) MSI von TYL A (rot).

Das m/z -Verhältnis von 365,1054, das mit $[M+Na]^+$ einer Dihexose zugeordnet werden könnte, zeigt keine Kolo-kalisation mit TYL A (Abbildung 4.29 B). Somit ist TYL A auf der Biofilm-PVC-Fläche eher vergleichbar den Phospholipiden lokalisiert. Dies ist ein Unterschied zum Verhalten von SDZ und TMP. Diese wurden an den Hotspots der Phospholipide nicht nachgewiesen. Im Gegensatz dazu ist TYL A nicht an den Stellen mit geringer Phospholipiddichte nachweisbar.

Auf dem ersten durchgeführten Kontroll-PVC-Coupon, der ohne Biofilm inkubiert wurde, konnte TYL A an punktuellen Orten nachgewiesen werden wie SDZ und TMP bei der ersten Durchführung der Kontrolle. Bei einer Wiederholung konnte dagegen TYL A auf der Oberfläche nicht mehr detektiert werden, sodass der Nachweis von TYL A auf der PVC-Fläche eindeutig dem Biofilm zugeordnet werden kann.

Aufgrund der HPLC-UV-Ergebnisse mit TYL A wurde eine Lokalisierung von TYL A auf der Biofilmfläche nicht erwartet (s. Kapitel 4.4.2.2). Es konnte kein Konzentrationsunterschied von TYL A zwischen Biofilmrohr und Kontrollrohr nachgewiesen werden. Deshalb wurde davon ausgegangen, dass TYL A nicht sorbiert oder diffundiert. Nun konnte TYL A eindeutig an den Stellen mit den Phospholipiden nachgewiesen werden. Eine Erklärung wäre, dass sich durch die 1:5-Probenverdünnung vor der HPLC-UV-Messung die Konzentrationsdifferenz verringerte und somit ein Unterscheid nachweislich nicht messbar war und/oder dass TYL A per MALDI-MS sehr empfindlich detektiert werden kann, sodass die Konzentration auf der Biofilmfläche sehr gering ist und mittels HPLC-UV die Konzentrationsunterschiede nicht nachgewiesen werden konnten.

4.4.4.3 Diskussion zur MALDI-MSI-Methode für die Anwendung bei Biofilmcoupons

Aus analytischer Sicht ist die hier durchgeführte MALDI-MSI ohne weitere Aufarbeitung eine schnelle und praktische Methode, um den Biofilm mittels der m/z -Verhältnisse von Phospholipiden darzustellen. Zusätzlich konnten Unterschiede in der Verteilung der Wirkstoffe aufgezeigt werden. Vorteil der HPLC-UV-Methode war, dass hierbei das Transformationsprodukt detektiert werden konnte, was durch MSI nicht möglich war. Dihexose als möglicher Marker für die EPS

müsste durch weitere Untersuchungen verifiziert werden. Unter anderem könnten bei einer Versuchswiederholung MS/MS-Experimente durchgeführt werden. Eine andere Möglichkeit wäre das Extrahieren der EPS, sodass die enthaltenden EPS-Bestandteile nachgewiesen und Proteine und Polysaccharide durch Derivatisierung und/oder proteolytischen Verdau identifiziert werden könnten. In anderen Studien konnten mittels MSI QS-Signale, weitere typische Metabolite und Matrixbestandteile ohne Aufarbeitung von Biofilmen detektiert werden (Phelan *et al.*, 2015; J. Y. Yang *et al.*, 2012; Y. L. Yang *et al.*, 2009). Dabei wurde ein MALDI-Matrix-Lösungsmix aus DHB und α -Cyano-4-Hydroxycimtsäure verwendet sowie ein Nährstoffmedium, das einen höheren Gehalt an Nährstoffen für das Biofilmwachstum hatte. Durch den dichteren Biofilm, die unterschiedliche Matrixlösung und die geringere räumliche Auflösung konnte in den Studien ein Zusammenhang zwischen dem Makrolid Azithromycin und der Biofilmausbreitung gezeigt werden (Phelan *et al.*, 2015). Dabei wurde kein direkter Vergleich zwischen der Verteilung des Wirkstoffs oder der Biofilmmatrixbestandteile gezogen, da die räumliche Auflösung zu gering war.

Die Visualisierung von Biofilmen mittels MSI ist eine gängige Methode um die Verteilung und Lokalisation von Markersubstanzen aufzuklären. In dieser Arbeit wurde diese Methode erstmals auf einen nativen Biofilm, der in einem Tränkwasserrohr unter praxisähnlichen Bedingungen gezüchtet wurde, angewendet. Auf eine gesonderte Biofilmzüchtung für das MSI wurde verzichtet, um den nativen Zustand des Biofilms aus Tränkwasserrohren besser abbilden zu können. Eine Aufarbeitung oder Probenpräparation wurde daher nicht durchgeführt. Mit dieser Vorgehensweise konnte die Verteilung der Bakterien sowie der verwendeten Wirkstoffe gut dargestellt werden. Die Visualisierung der Biofilmmatrix stellte sich wegen der geringen Anteile und geringeren Empfindlichkeit insgesamt als schwierig dar. Für weitere Fragestellungen müssten die experimentellen Untersuchungen z. B. durch Derivatisierungen ergänzt werden.

4.4.5 Diskussion der Interaktionen zwischen den Modellbiofilmen und ausgewählten Veterinärantibiotika

Bei den ubiquitär in Wasserleitungen vorkommenden Biofilmen und durch die Verabreichung von Veterinärantibiotika über Tränkwasserleitungen lag die Vermutung nahe, dass Biofilme und Antibiotika miteinander wechselwirken und dies eine Auswirkung auf die Verwendung der Antibiotika und/oder auf eine Entwicklung von AB-Resistenzen haben könnte. Zur Prüfung dieser Hypothese wurden zwei Modellbiofilme entwickelt. Für realistische Bedingungen, wie sie in Trink- und Tränkwasserleitungen vorliegen, wurde sich für oligotrophe Medien, für die Temperatur von 22 °C und PVC als Rohrmaterial entschieden. Dabei wurde die Verwendung eines kontinuierlichen Medienflusses ausgeschlossen, auch wenn dies einen Einfluss auf die Biofilmbildung und auch auf die Wechselwirkung zwischen Biofilm und Antibiotika haben kann. Letzteres wurde für die Wechselwirkung zwischen Biofilm und Desinfektionsmitteln nachgewiesen (Buckingham-Meyer *et al.*, 2007; Simões *et al.*, 2003). Ein kontinuierlicher Fluss in einer

Modelltrinkwasserleitung erschwert präzise Aussagen zur Wirksamkeit der Antibiotika auf Biofilme und deren Reaktion, da unter anderem bei der regelmäßigen Zugabe von frischen Medien durch die Verdünnung die Empfindlichkeiten in den Messmethoden sinken und so bestimmte Wechselwirkungen nicht nachweisbar wären. Unter Berücksichtigung dieser Faktoren wurde ein statisches Modell entwickelt, das ermöglicht, grundlegende Bewertungen hinsichtlich der Biofilm-Antibiotika-Wechselwirkungen in der Umgebung von Wasserversorgungsleitungen durchzuführen.

Es konnten Modellbiofilme hergestellt werden (Kapitel 4.3), die so in ihrer Biofilmdichte und Zusammensetzung nach Maes *et al.* (2019) in Geflügelställen nachgewiesen wurden. Die Wiederholbarkeit für beide Stämme war durch eine Standardabweichung unter 0,5 gegeben (Goeres *et al.*, 2019; Parker & Hamilton, 2011). Bei der Biofilmzusammensetzung zeigte sich, dass diese von der Pseudomonadenart abhängig war. Der stärkere Biofilmbildner *P. aeruginosa* wies eine höhere Biofilmdichte im Vergleich zu *P. fluorescens* auf, dass Heydorn *et al.* (2000) ebenfalls im Vergleich unter verschiedenen Pseudomonadenarten aufzeigen konnten. Mit 3 logarithmischen Stufen niedriger war *E. coli* dagegen bei dem starken Biofilmbildner *P. aeruginosa* in deutlich geringeren Anteilen enthalten als bei dem *P.-fluorescens*-Biofilm, in dem beide Stämme zu gleichen Anteilen vorlagen. Dies lässt sich durch konkurrierende und gegenseitige Beeinflussung erklären, sodass *E. coli* an seiner weiteren Vermehrung gehindert wurde. Dieser Effekt wurde bereits bei einem Biofilm bestehend aus *P. aeruginosa* und *E. coli* nachgewiesen (Mirani *et al.*, 2018).

Bei der Konfrontation der Modellbiofilme aus *E. coli* und *P. fluorescens* oder *P. aeruginosa* konnten für die verschiedenen Wirkstoffe unterschiedliche Reaktionen nachgewiesen werden. Durch die schnelle SDZ- und TMP-Konzentrationsänderung des Biofilmrohrs bei beiden Modellbiofilmen im Vergleich zur abiotischen Kontrolle wurde eine Diffusion in oder Sorption an den Biofilm vermutet. Dies wurde durch eine erhöhte SDZ-Gehaltsmessung in den PBS-Waschlösungen beider Modellbiofilme bestätigt. Die Messung mittels MALDI-MS und das folgende MS-Imaging belegen ebenfalls das Zurückbleiben der Wirkstoffe auf dem PVC-Coupon für den *P.-fluorescens*-Biofilm und konnten zeigen, dass SDZ und TMP an den Stellen mit ausgewählten Phospholipiden festgehalten wurden. Dabei waren die Wirkstoffe nicht an den Stellen sichtbar, an denen die Phospholipide sehr hohe Intensitäten aufwiesen. Eine hohe Intensität der Phospholipide steht für eine hohe Bakteriendichte. Daher könnten hier Wirkstoffe eventuell tiefer eingedrungen sein, was durch das verwendete MALDI-Verfahren allerdings nicht erfasst werden konnte.

Mittels HPLC-UV konnten bei der TYL-A-Konfrontation des *P.-aeruginosa*-Biofilms ebenfalls direkt bei der ersten Probenahme und über den Versuchszeitraum hinweg gleichbleibend geringere Konzentration gemessen werden als in der abiotischen Kontrolle. Dies lässt wie bei SDZ und TMP bei beiden Biofilmen auf eine schnelle Sorption oder Diffusion vermuten. Im Gegensatz dazu wurden bei der Konfrontation des *P.-fluorescens*-Biofilms mit TYL A keine Hinweise auf eine

Diffusion oder Sorption ermittelt, da die Anfangskonzentration im Biofilmrohr und in der abiotischen Kontrolle nahezu gleich waren. Dafür wurde mittels HPLC-UV ein neuer Peak im UV-Chromatogramm detektiert, der im Laufe des Versuchszeitraum stetig zunahm. Der Gehalt an TYL A im Biofilmrohr hingegen nahm gleichzeitig kontinuierlich ab. In den PBS-Waschlösungen konnte kein TYL A nachgewiesen werden, das ebenfalls gegen eine Diffusion oder Sorption spricht. Mittels MALDI-MS und der anschließenden Bildgebung wurde für den *P. fluorescens*-Biofilm nachgewiesen, dass auch TYL A auf der PVC-Biofilmfläche vorhanden war. Hierbei konnte TYL A nur auf den intensiven Phospholipid-Hotspots detektiert werden. Da die verwendeten Antibiotika per MALDI-MS nicht quantifiziert wurden, kann bezüglich der TYL-A-Konzentration auf der Fläche keine Aussage getroffen werden. Vermutet wird, dass die Empfindlichkeit mittels HPLC-UV bei den Vergleichsmessungen zwischen behandeltem Biofilmrohr und der abiotischen Kontrolle zu gering war. Deutlich geringere Konzentrationen konnten mittels MALDI effizient ionisiert und somit noch detektiert werden. Das Verbleiben von TYL A an den Phospholipiden spricht gegen eine Diffusion in den Biofilm, und im Zusammenhang mit den HPLC-UV-Ergebnissen eher für eine geringfügige Sorption.

Makrolide, Sulfonamide und TMP haben unterschiedliche physikochemische Eigenschaften. Ein Grund für die unterschiedlichen Reaktionen der Biofilme auf die Antibiotikawirkstoffe könnte auch das Molekulargewicht sein. TYL A ist mit 916,1 g/mol im Vergleich zu SDZ (250,3 g/mol) und TMP (290,3 g/mol) ein deutlich größeres Molekül. Lu *et al.* (2014) konnten an verschiedenen inerten Harzen als Biofilmvorversuchsmodelle zeigen, dass die Adsorptionskinetik von der Molekülgröße abhängt. Dabei wurden TYL A und Ciprofloxacin (CIP, 331,5 g/mol) unterschiedlich stark adsorbiert. TYL A hatte die größte Adsorption am makroporösem Harz XAD-4 und CIP an dem mikroporösem Harz MN-202. Für die ähnlich großen Wirkstoffe Tobramycin (467,5 g/mol) und Ciprofloxacin konnten bei mukoiden *P. aeruginosa*-Biofilmen ähnliche Penetrationen nachgewiesen werden (Walters *et al.*, 2003). Somit könnte die jeweilige Zusammensetzung der Modellbiofilme die verschiedenen Interaktionen erklären. Bei dem *P. aeruginosa*-Biofilm konnten die unterschiedlich großen Wirkstoffe nahezu gleich stark adsorbieren oder diffundieren, sodass dies auf andere WW zwischen Wirkstoff und Biofilm hinweist und die Porengrößen von untergeordneter Bedeutung sind. Bei dem *P. fluorescens*-Biofilm dagegen zeigte sich, dass bei TYL A kaum und bei SDZ und TMP ein Konzentrationsunterschied bestimmbar war, sodass in diesem Biofilm die Molekülgröße der Wirkstoffe ausschlaggebend sein könnte.

Ebenfalls könnte die Ladung der Wirkstoffe das Verhalten bezüglich des Biofilms erklären, da ionische Wechselwirkungen zwischen Biofilm-Matrix-Komponenten und Antibiotika deren Fähigkeiten zur Diffusion oder Sorption beeinflussen (Cao *et al.*, 2016; Tseng *et al.*, 2013). Bei dem vorherrschenden pH von 7 liegt SDZ teilweise anionisch und TMP überwiegend neutral und teilweise kationisch vor (Reeves & Wilkinson, 1979; Sakurai & Ishimitsu, 1980). Dagegen ist TYL A mit einem pKa von 7,7 überwiegend kationisch in Lösung (Guo *et al.*, 2014). Die EPS von Biofilmen

mit *P. aeruginosa* und *P. fluorescens* sind unterschiedlich zusammengesetzt (Fazli *et al.*, 2014). Bei dem *P. fluorescens*-Biofilm konnten vor allem große Oberflächenproteine nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurden bei dem Biofilm mit *P. aeruginosa* mehr Exopolysaccharide wie Alginat, Pel (einem teilweise acetylierten Polysaccharid aus Galactosamin und Glucosamin) und Psl bestimmt (Fazli *et al.*, 2014; Jennings *et al.*, 2015). In Biofilmstudien wurde Psl, einem neutralen Polysaccharid aus Pentasaccharid-Untereinheiten mit Mannose, Rhamnose und Glucose, mit den kationischen Antibiotika Colistin und Tobramycin und dem anionischen CIP mit unterschiedlichen Ionenstärken konfrontiert (Billings *et al.*, 2013; Passos da Silva *et al.*, 2019). Dabei zeigte sich, dass sich die Kapazität zur Matrixsorption der Wirkstoffe durch die elektrostatischen Wechselwirkungen und durch die Zusammensetzung der EPS selbst erklären ließ (Billings *et al.*, 2013). Psl konnte dabei in Abhängigkeit von vorhandenen Substanzen verschiedene Ladungszustände einnehmen, sodass sich der Ladungszustand der EPS durch Psl an die Wirkstoffe anpasst und dementsprechend die hier verwendeten zurückhalten könnte. Die unterschiedliche Zusammensetzung der EPS von *P. fluorescens* und *P. aeruginosa* könnte das unterschiedliche Verhalten von TYL A erklären, sodass seine kationisch vorliegende Form eher mit Exopolysacchariden wechselwirkt als mit den Oberflächenproteinen von *P. fluorescens*. Im Vergleich dazu haben die EPS von *P. aeruginosa* einen größeren Einfluss auf SDZ und TMP als die von *P. fluorescens*, da SDZ und TMP dort prozentual eher zurückgehalten und in der Rohrlösung entsprechend weniger detektiert wurden.

Der hydrophobe Charakter einer EPS kann eine weitere Erklärung für Interaktionen zwischen Biofilm und Wirkstoffen sein. Ein Vorhersagemodell für hydrophobe Wechselwirkungen ist der logarithmische *n*-Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient ($\log K_{ow}$). TYL A besitzt von den drei Wirkstoffen den höchsten $\log K_{ow}$ -Wert mit 1,63, gefolgt von TMP mit 0,91 und SDZ mit -0,09 (McFarland *et al.*, 1997; Rekker *et al.*, 1993; Thiele-Bruhn & Aust, 2004). Demnach könnte das Verhalten von TYL A mit einem höheren $\log K_{ow}$ -Wert ein Indiz für Wechselwirkungen mit hydrophober EPS sein. Dies ist für die beiden Modellbiofilme keine eindeutige Erklärung, da TYL A zwar im *P. aeruginosa*-Biofilm zurückgehalten wird, aber gleichermaßen auch SDZ und TMP. Somit scheinen hierbei die hydrophoben Wechselwirkungen nicht die alleinige Erklärung für das Verhalten der Wirkstoffe zu sein. Sorptionsstudien mit Erythromycin ($\log K_{ow}$ 0,98) im Vergleich mit Ciprofloxacin ($\log K_{ow}$ -0,4) und Sulfamethoxazol ($\log K_{ow}$ <-0,59) zeigen, dass Sulfamethoxazol den niedrigsten und Ciprofloxacin den größten Biofilmverteilungskoeffizienten besaßen. Erythromycin lag etwas höher als Sulfamethoxazol (Wunder *et al.*, 2011). Schlussfolgernd kam das $\log K_{ow}$ -Modell für diese Interaktionserklärungen der Analyten bei der Studie von Wunder *et al.* (2011) und der hier durchgeführten Arbeiten nicht in Frage. Somit lässt sich die Interaktion der Wirkstoffe mit den Modellbiofilmen in erster Linie durch die Molekülgröße, die spezifischen Eigenschaften wie die Ionenladung sowie die Zusammensetzung der EPS erklären.

Die Untersuchungen der TYL-A-Gehalte im *P.-fluorescens*-Biofilm zeigten keine deutliche Tendenz hinsichtlich Sorption oder Diffusion. Dagegen konnte gezeigt werden, dass durch die Anwesenheit des Biofilms und der EPS ein Transformationsprodukt aus TYL A entstand. Eine Substanz zu transformieren gehört zu den Toleranzmechanismen von Biofilmen gegenüber Antibiotika. Bekannte Mechanismen sind dabei Acylierung, Phosphorylierung, Glykosylierung, Nukleotidierung, Ribosylierung und der Thiol-Transfer (Nadeem *et al.*, 2020; Terzic *et al.*, 2011; Wright, 2005). Bekannt für Makrolide wie Erythromycin ist eine Makrolid-Esterase, die den Laktonring hydrolysiert (Barthélémy *et al.*, 1984). Um den Transformationsmechanismus aufzuklären wurde mittels HPLC das TP isoliert und dann per HR-MS gemessen. Auf die Auswertung der HR-MS-Ergebnisse zum Thema TYL-A-Transformationsprodukt wird ausführlich in Kapitel 4.5 eingegangen. Mittels HPLC-UV konnte am Ende des Versuchs ein Gehalt des TP von 0,7 % an TYL A abgeschätzt werden. Die TYL-A-Konzentration verringerte sich im gleichen Zeitraum um 3,4 %. Das Nichtübereinstimmen der prozentualen Zunahme des TP mit der Abnahme von TYL A kann an unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten liegen, sodass das TP bei 280 nm schwächer absorbiert. Eine andere Möglichkeit wäre die Bildung weiterer Transformationsprodukte, die in dem UV-Bereich von 250 – 350 nm kaum oder nicht absorbieren (J. Werner *et al.*, 2007).

Auf mikrobieller Ebene konnte mit diesem Versuchsaufbau des Modellbiofilms gezeigt werden, dass die Biofilmdichte und -zusammensetzung und die planktonischen Zellen durch verschiedene Antibiotika unterschiedlich beeinflusst wurden. Bei der Konfrontation mit SDZ und TMP wurden für alle Stämme in beiden Modellbiofilmen nur marginale Veränderungen im Vergleich zur biotischen Kontrolle festgestellt, sodass die Biofilmdichte und -zusammensetzung sich nicht veränderte. Die untersuchten *E.-coli*-Isolate blieben nach der Konfrontation phänotypisch sensibel gegenüber SDZ und TMP sowie auch anderen Antibiotika (Tabelle 4.19). Dies kann bedeuten, dass die beobachtete Toleranz von *E. coli* mit den spezifischen Merkmalen des Biofilmzustandes zusammenhängen könnte. Als wichtige Toleranzmechanismen werden das Verhindern der Antibiotikapenetration durch die extrazelluläre Matrix und/oder die metabolische Aktivität von Zellsubpopulationen beschrieben (Flemming *et al.*, 2016). Da die HPLC-UV-Analysen ergaben, dass ein Teil der Biofilmzellen in Berührung mit den Antibiotika kam, kann dies auf das Vorhandensein von metabolisch weniger aktiven Zellsubpopulationen hindeuten. Beispiele für weniger aktive Zellsubpopulationen mit langsamen Wachstumsraten oder Ruhephasen von Zellen sind Bakterien mit einem reduzierten Stoffwechsel (viable but non culturable (VNBC)) und persister cells (Flemming *et al.*, 2016). Auffällig war bei dem Vergleich der optischen Bilder mittels Lichtmikroskop die Verteilung der Zellen. Auf dem Coupon der biotischen Kontrolle waren die Zellen gleichmäßig verteilt. Dagegen konnte bei dem Coupon nach Konfrontation mit SDZ und TMP eine Clusterbildung der Zellen beobachtet werden. Dies zeigt, dass keine Veränderung der Biofilmdichte und -zusammensetzung nachgewiesen werden konnte, aber durch

die Konfrontation sich die Biofilmmorphologie veränderte. So konnte nach der Konfrontation mit dem Antibiotikum Ciprofloxacin mit einem Biofilm aus *P. aeruginosa* ebenfalls eine Clusterbildung beobachtet werden (Chatterjee *et al.*, 2014).

Bei der Konfrontation mit TYL A konnte bei allen Zellgehalten eine Verminderung im Vergleich zur biotischen Kontrolle festgestellt werden. Dass SDZ und TMP Einfluss auf den sensiblen *E.-coli*-Stamm haben, wurde erwartet. Dagegen wird TYL A normalerweise gegen grampositive Erreger und Mycoplasmen eingesetzt (FVE, 2016). Dennoch konnte in Studien auch eine geringe bakterielle Aktivität gegenüber manchen gramnegativen Bakterien nachgewiesen werden, deren äußere Membran normalerweise gegen transmembrane Diffusion von Makroliden geschützt ist (Arsic *et al.*, 2018; Knothe, 1977; Vaara, 1993). Darüber hinaus ist eine Hemmung der Exopolysaccharidsynthese durch Makrolide beschrieben worden, worauf die strukturelle Konfiguration von Biofilmen von grampositiven Bakterien wie *Streptococcus suis* und gramnegativen wie *P. aeruginosa* und *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium beeinflusst wurde (Mechesso *et al.*, 2019; S. Wang *et al.*, 2016; Wozniak & Keyser, 2004). In den hier durchgeführten Biofilmexperimenten wurden eher minimale Wachstumsbedingungen gewählt, sodass es unwahrscheinlich ist, dass der geringere Bakteriengehalt der exponierten Biofilme auf die antibakterielle Aktivität von TYL A zurückzuführen ist. Wahrscheinlicher sind dabei die oben erwähnten Beobachtungen bezüglich des Einflusses auf die EPS-Produktion und die darauffolgende Verringerung der kultivierbaren Bakterien. Basierend auf den HPLC-UV-Analysen konnten die Stämme aus dem Modellbiofilm Transformationsmechanismen (z. B. Inaktivierung durch Enzyme) aktivieren, um den Einfluss von TYL A auf den Biofilm zu reduzieren (Lutz *et al.*, 2012; Wozniak & Keyser, 2004). Zusätzlich konnte auch hier eine Clusterbildung der Zellen nach TYL-A-Konfrontation mittels Lichtmikroskop beobachtet werden.

Beim Empfindlichkeitstests mittels MHK-Bestimmung konnte keine Veränderung für die *E.-coli*-Isolate bestimmt werden. Dies bedeutet, dass bei einer einmaligen Anwendung der verwendeten Antibiotika der Selektionsdruck möglicherweise nicht ausreicht, um resistente Bakterien im Wasserbiofilm auszubilden, wofür Mutationsprozesse ausgelöst werden müssten (Schwarz *et al.*, 2001). Auch wenn die Ergebnisse zeigen, dass eine einmalige Anwendung keine oder nur eine geringe Bedeutung für die Resistenzentwicklung bei empfindlichen Bakterien haben kann, wiederholen sich in der Praxis die Behandlungen mit denselben und/oder anderen Wirkstoffen über einen längeren Zeitraum. Durch eine Vielzahl an Behandlungen könnte der Selektionsdruck erhöht werden und dann die Mutationsprozesse auslösen. Andererseits konnte bei einer langen Exposition mit Spurenkonzentrationen von Antibiotika in einem Trinkwassersystem keine Veränderung der Antibiotika-Empfindlichkeit nachgewiesen werden (Gomes *et al.*, 2018). Somit muss die Rolle der Biofilm-Antibiotika-Wechselwirkungen bei der Medikation über das Tränkwasser noch im Detail geklärt und bezüglich einer möglichen Resistenzausbildung umfassender untersucht werden.

Es konnte also gezeigt werden, dass die entwickelten Modellbiofilme geeignet sind erste Hinweise von Interaktionen zwischen Biofilm und Antibiotika aufzudecken. Mit den etablierten Untersuchungsverfahren könnten zum Beispiel Medikamente hinsichtlich ihrer Eignung für die Verabreichung über das Tränkwasser getestet werden. Dieses Modell ist nur ein Anfang, um Mechanismen und Interaktionen zwischen Biofilm und Wirkstoffen zu erkennen und besser zu verstehen. Dabei könnten zukünftig auch andere Wirkstoffe in diesem System eingesetzt werden. Eine mögliche Resistenzbildung könnte z.B. durch eine wiederholte Konfrontation besser überprüft werden.

4.5 Charakterisierung der Transformationsprodukte von Tylosin A

4.5.1 Vorgehen zur Identifizierung

Während der Konfrontation von TYL A mit dem Biofilm aus *P. fluorescens* konnte im UV-Chromatogramm ein neuer Peak detektiert werden (Kapitel 4.4.2.2). Es stellte sich heraus, dass dieser Peak im direkten Zusammenhang mit TYL A und dem Biofilm steht, und deshalb als mögliches Transformationsprodukt (TP) von TYL A charakterisiert wurde. Das TP sollte nun isoliert und identifiziert werden. Dabei konnte nicht auf eine präparative PFP-Säule zurückgegriffen werden, da diese in der Arbeitsgruppe nicht zur Verfügung stand. Die entwickelte Methode für die analytischen Routinemessungen konnte somit nicht direkt übertragen werden. Versuche zur Isolierung von TP mit einer präparativen C18-Säule waren nicht erfolgreich aufgrund einer unzureichenden Trennung von TP und den Metaboliten TYL B, C und D und Verbindungen aus der Biofilmmatrix.

Um das TP dennoch für analytische Zwecke nutzbar zu machen und anzureichern, wurden die Rohre ausschließlich mit *P. fluorescens* beimpft und ein Biofilm für 7 Tage entwickelt. Das Medium wurde mit einem höheren Nährstoffgehalt hergestellt und die Temperatur erhöht, um bessere Wachstumsbedingungen zu schaffen (Details Kapitel 5.5.4). Der Versuch, die Anfangskonzentration von TYL A zu erhöhen, konnte nicht genutzt werden, da dadurch die Metabolite ebenfalls in höheren Konzentrationen auftraten und es zu Peaküberlagerungen kam, die die Trennung erschwerte. Während der Anreicherung von TP (TP1) über einen Versuchszeitraum von 3 Wochen wurde festgestellt, dass neben dem bisher detektierten TP von TYL A noch ein weiteres TP (TP2) detektiert werden konnte. Daraufhin wurden die Proben aus dem Biofilmversuch (Kapitel 4.4.2.2), mit einer angepassten HPLC-UV-Methode (Details Kapitel 5.3.3.1) untersucht und festgestellt, dass sich TP2 ebenfalls innerhalb des Versuchszeitraum von 7 Tagen bildete und in der vorherigen HPLC-Methode zur gleichen Retentionszeit wie TYL B eluierte (Abbildung 4.12). Die Gehalte des TP2 sind vergleichsweise gering, weshalb sie im Versuchszeitraum in Kapitel 4.4.2.2 nicht unmittelbar erkannt wurden (als Schulter von TYL B).

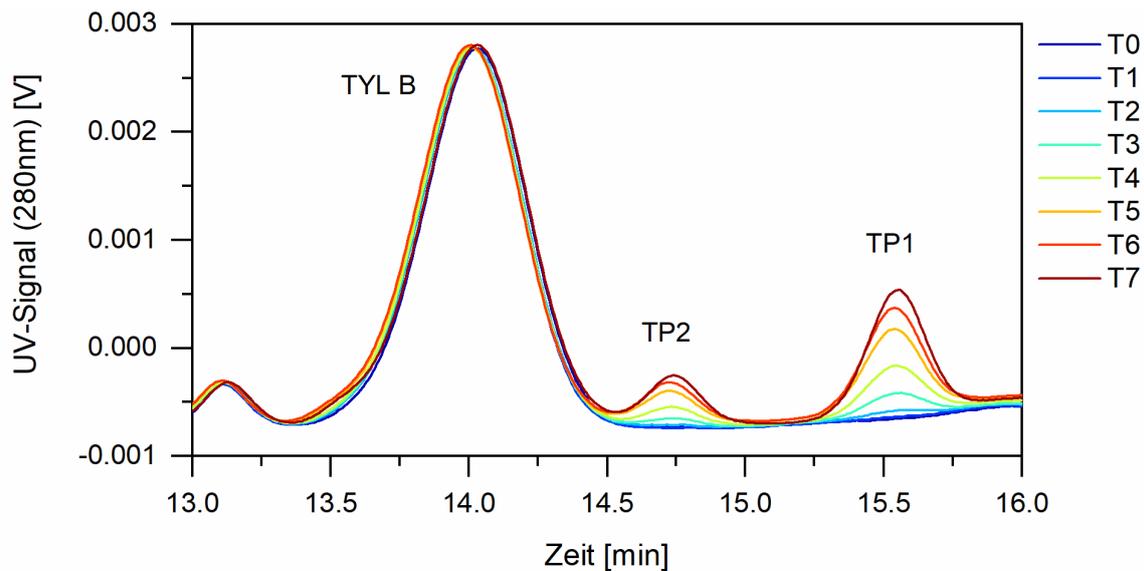


Abbildung 4.30: UV-Chromatogrammausschnitt von TP1 und TP2 von TYL A im Biofilmrohr im Versuchszeitraum von 7 Tagen, mittels neuer adaptierter HPLC-UV-Methode.

TP1 und TP2 konnten mit der adaptierten HPLC-UV-Methode von TYL B getrennt dargestellt werden (Abbildung 4.30). Am letzten Tag des 7-tägigen Modellbiofilmversuches betrug der Anteil von TP1 im Biofilmrohr 0,73 % und TP2 0,24 % (jeweils bezogen auf TYL A). Die Gehalte waren für weitere analytische Untersuchungen zu gering. Bei der Anreicherung in einem neuen Biofilmansatz über einen längeren Versuchszeitraum von 30 Tagen konnte der Anteil von TP2 auf 5 % sowie der von TP1 auf 16 % gesteigert werden.

4.5.2 Stabilitätsuntersuchungen des Transformationsproduktes

Da das Isolieren des TP nicht den gewünschten Erfolg brachte, wurde eine TP-haltige Probe mit allen enthaltenden TYL-Metaboliten aus der Biofilmlösung auf verschiedene Stabilitätsparameter mittels HPLC-UV untersucht. Die Lösung enthielt 16 % TP1, bezogen auf den Tagesstandard von TYL A von 40 µg/mL, und wurde in den in Tabelle 4.20 aufgeführten Lösungen angesetzt. Dabei wurden verschiedene organische Säuren ausgewählt, um deren Stabilitätseinfluss oder eventuelle Austauschreaktionen im TP nachzuweisen. Weiterhin fiel die Wahl auf Reinstwasser und einer Natriumhydroxidlösung sowie auf zwei Lösungsmittel, die oft zum Ansetzen von Stammlösungen verwendet werden.

Tabelle 4.20: Lösungen zur Untersuchung der Stabilität von TP von TYL A.

Parameter	Spezifikation
Sauer	0,5 %-ige Ameisensäurelösung
	0,5 %-ige Essigsäurelösung
	0,5 %-ige Propionsäurelösung
	0,1 M KH_2PO_4 -Lösung
	Reinstwasser
Basisch	0,1 M Natriumhydroxid-Lösung
Lösungsmittel	Methanol
Lösungsmittel	Acetonitril*

* Der Versuch mit Acetonitril wurde zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt und weist deshalb nicht die gleichen Messzeitpunkte auf.

Der Gehalt von TYL A und die abgeschätzten Gehalte von TYL B sowie den beiden Transformationsprodukten (TP1 und TP2) wird prozentual auf die Fläche von TYL A zum Messzeitpunkt 0 in Wasser bezogen.

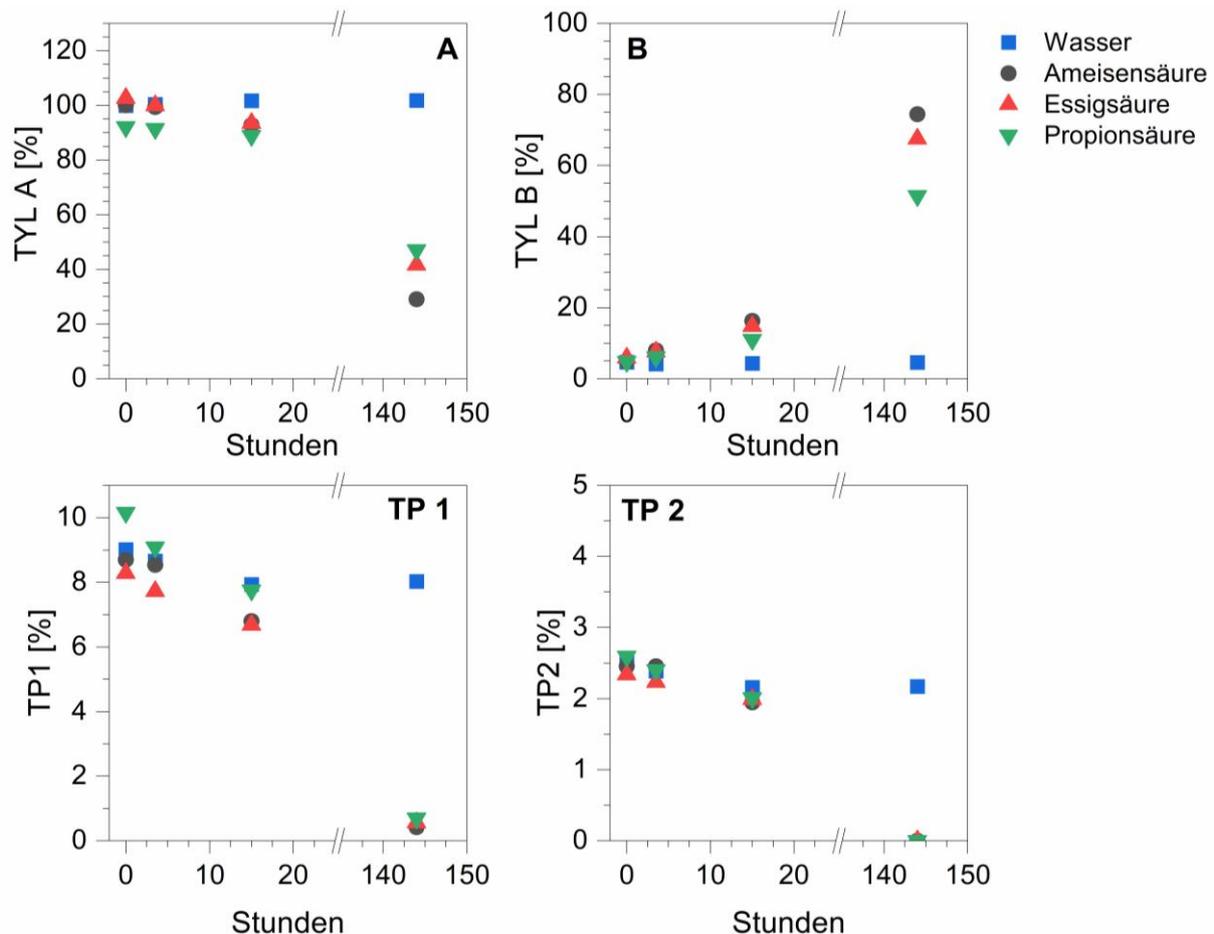


Abbildung 4.31: Stabilität von TYL A (A) und TYL B (B) sowie von zwei Transformationsprodukten von TYL A (TP 1 und TP 2) in Wasser und verschiedenen sauren Lösungen zu den Messzeitpunkten 0, 4 und 15 Stunden sowie nach 6 Tagen (144 h); Ergebnisse beziehen sich auf die Fläche von TYL A zum ersten Messpunkt in der Wasserprobe; y-Achsen sind verschieden skaliert und die x-Achse wird unterbrochen für eine bessere Darstellungsweise.

Aus den Ergebnissen zur Stabilität in Wasser und den organischen Säuren lässt sich schließen, dass TYL A im Wasser am stabilsten war (Abbildung 4.31 A). In den sauren Lösungen verringerte sich der TYL-A-Gehalt, wobei der Anteil von TYL B von 5 % auf ca. 60 bis 80 % anstieg. Die saure Hydrolyse von TYL A zu TYL B ist in der Literatur beschrieben (Hu & Coats, 2007). Die beiden Transformationsprodukte verhalten sich in den Lösungen ähnlich wie TYL A. Im Wasser schienen sie relativ stabil zu sein und in den sauren Lösungen nahm der prozentuale Anteil mit der Zeit ab. Am letzten Messpunkt konnte TP1 noch mit einem Anteil von 0,5 % bestimmt werden. Dagegen konnte für TP2 kein Peak detektiert werden, sodass wahrscheinlich TP1 und TP2 ebenfalls, wie TYL A zu TYL B, hydrolysierten.

In den UV-Chromatogrammen der sauren Lösungen konnte vor TYL B ein neuer Peak detektiert werden. Die Probe wurde mittels LC-MS gemessen und das zugehörige m/z -Verhältnis ermittelt (Abbildung 4.32).

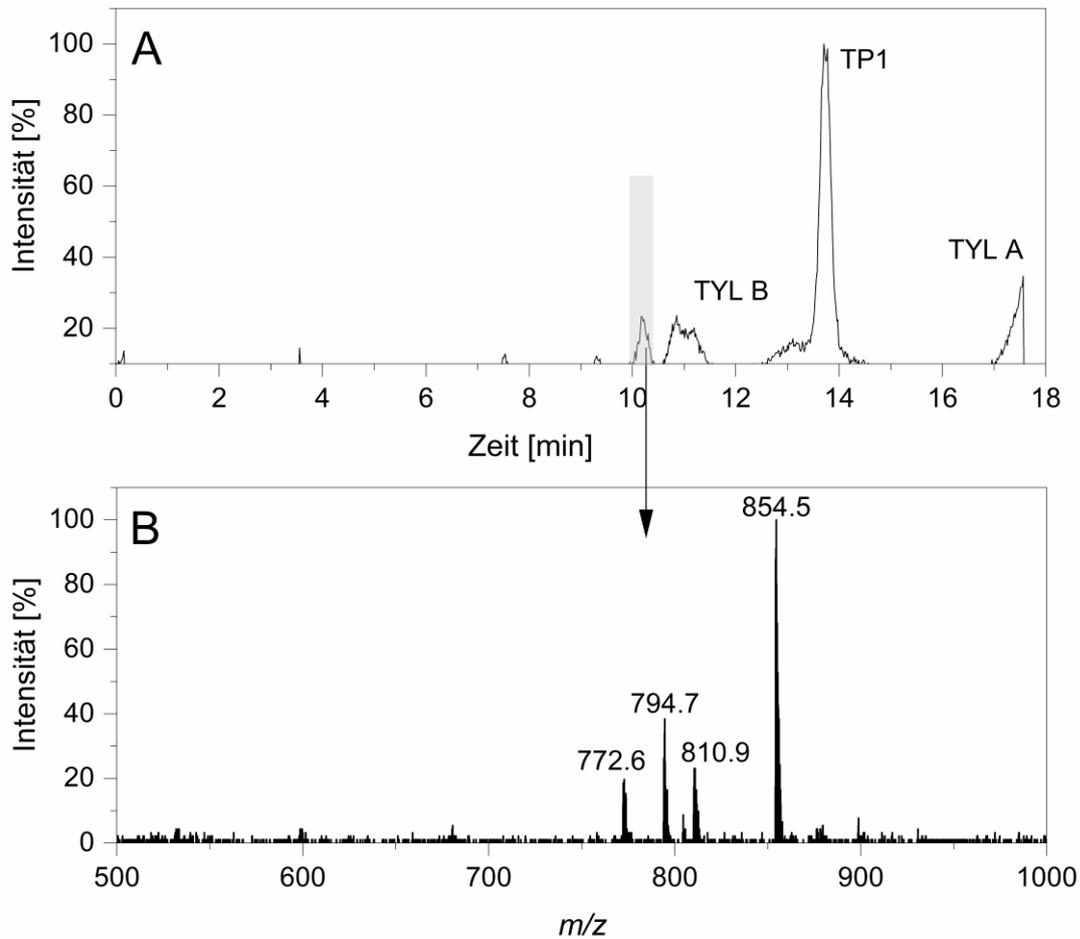


Abbildung 4.32: **A)** TIC-Ausschnitt einer isolierten Probe von TP1 mittels LC-QTRAP; ab 17,5 min erfolgte keine Datenaufnahme wegen der hohen Intensität von TYL A; **B)** Massenspektrum des Peaks bei 10,18 min (in A grau markiert).

Der neu entstandene Peak wies ein m/z -Verhältnis von 854 auf (Abbildung 4.32 B). Aus TYL A entsteht bei saurer Hydrolyse TYL B, da Mycarose abgespalten wird. Das Produkt mit m/z -Verhältnis von 854 wies eine Abspaltung von Mycarose als Differenz zur ermittelten m/z -Verhältnis von TP1 (m/z -Verhältnis von 998, Kapitel 4.5.3.3) auf. Dementsprechend kann es sich bei dem neuen Peak um das Hydrolyseprodukt von TP1 handeln.

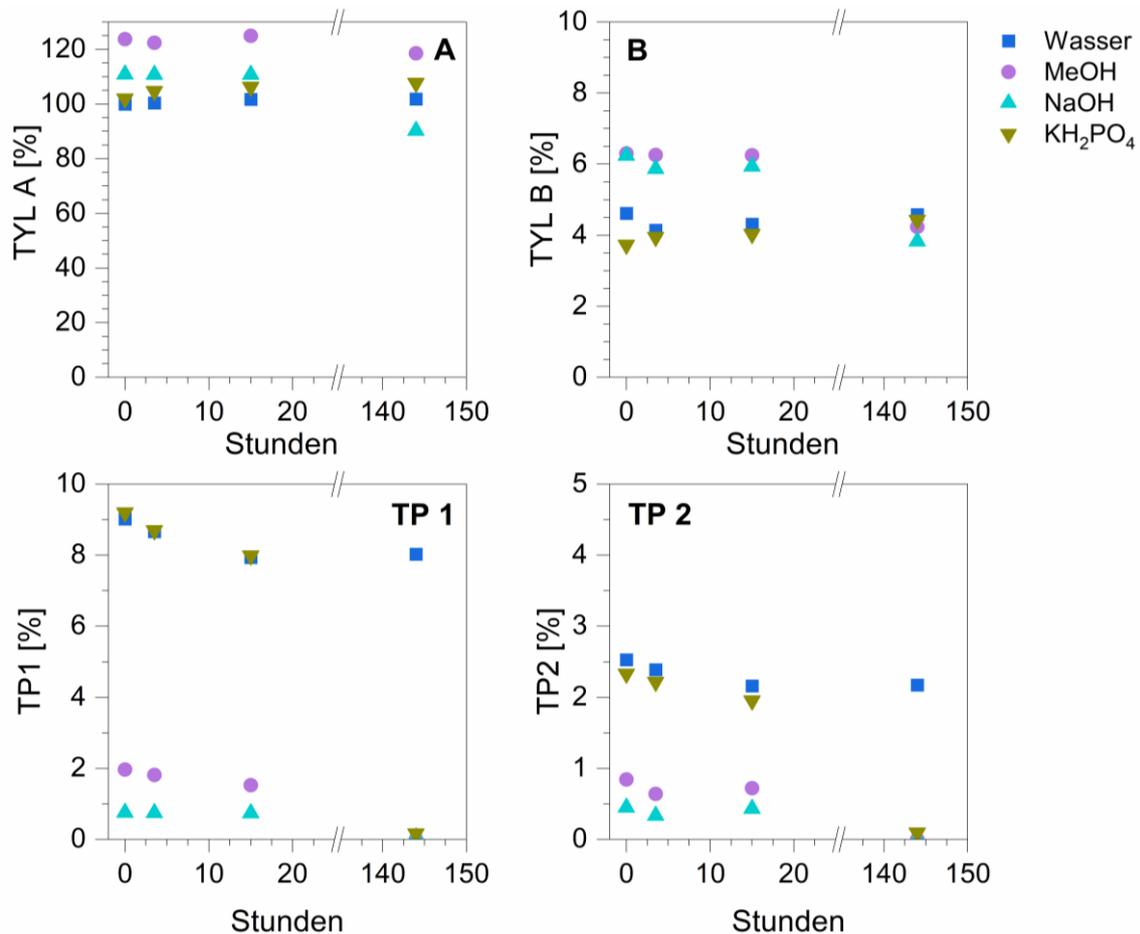


Abbildung 4.33: Stabilität von TYL A (A) und TYL B (B) sowie von zwei Transformationsprodukten (TP 1 und TP 2) von TYL A in Wasser, Methanol, Natriumhydroxid- und Phosphatpufferlösung zu den Messzeitpunkten 0, 4 und 15 Stunden sowie nach 6 Tagen (144 h); Ergebnisse beziehen sich auf die Fläche von TYL A zum ersten Messpunkt in der Wasserprobe; y-Achsen sind verschieden skaliert und die x-Achse wird unterbrochen für die bessere Darstellungsweise.

In Methanol und in Natriumhydroxid-Lösung konnte bereits am ersten Messzeitpunkt ($t = 0$) ein höherer TYL-A-Gehalt als in Wasser detektiert werden (Abbildung 4.33). TP1 und TP2 wurden in diesen beiden Lösungen mit einem deutlich geringeren Anfangsgehalt als in Wasser nachgewiesen. Daraus ließ sich schließen, dass direkt nach Zugabe dieser Lösungen die beiden TP instabil waren. Im UV-Chromatogramm bei 280 nm wurde kein neuer Peak detektiert. Somit könnten beide TP in TYL A umgewandelt worden sein. Der TYL-B-Gehalt war in beiden Lösungen höher als in der Wasserprobe, nahm im Laufe des Messzeitraums aber wieder ab. Die Phosphatpufferlösung zeigte im Vergleich zu den ersten drei Messpunkten ein ähnliches Verhalten wie Wasser. Nach 6 Tagen waren in der Phosphatpuffer- sowie in der Methanol- und Natriumhydroxidlösung dagegen keine TP mehr detektierbar.

In Tabelle 4.21 sind die Ergebnisse zu dem Versuch mit Acetonitril aufgeführt. Der Versuch wurde nur mit zwei Messpunkten durchgeführt.

Tabelle 4.21: Ergebnisse zur Stabilität von TYL A und B sowie TP1 und 2 in Acetonitril.

Messzeitpunkt	Prozentualer Gehalt (bezogen auf TYL A _{0, Wasser}) [%]			
	TYL A	TYL B	TP 1	TP 2
In Wasser				
0 Stunden	100,0	4,66	9,56	3,06
In Acetonitril				
0 Stunden	119,7	5,78	4,75	1,34
48 Stunden	122,0	6,42	3,76	1,15

In Acetonitril stieg der TYL-A-Gehalt unmittelbar an und der Anteil an TP1 und TP2 ging im Vergleich zur Wasserlösung um die Hälfte zurück. TYL B stieg leicht an. Weitere Peakzu- oder -abnahmen konnten nicht detektiert werden.

Das Isolieren der Transformationsprodukte mittels präparativer HPLC mit Methanol und Acetonitril im Eluenten war letztendlich problematisch, da sich beide TP möglicherweise zu TYL A umwandeln und nicht mehr isoliert vorlagen. Somit wurde auf ein zügiges Arbeiten geachtet. Ungewöhnlich ist, dass die TP in Wasser stabil und in Methanol instabil sind und TYL A in beiden Lösungsmitteln stabil ist. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht werden.

4.5.3 Ergebnisse der MS-Messungen

4.5.3.1 Transformationsprodukt 1 (TP1)

Da die präparative HPLC nicht verwendet werden konnte (Kapitel 4.5.1), wurden erste Isolationsversuche zur Ermittlung eines hochauflösenden m/z -Verhältnis mittels analytischer HPLC durchgeführt. Dabei wurden die in einem Biofilmansatz für 30 Tage TP-angereicherten Proben mit einem höheren Injektionsvolumen (100 μ L) verwendet. Es wurden mehrere Fraktionen von TP1 gesammelt, eingengt und in Acetonitril/Wasser für die HR-MS aufgenommen und zur Direktinjektion am QTOF verwendet. Aufgrund der Instabilität der TP in Methanol und Acetonitril wurde hierbei auf zügiges Arbeiten geachtet.

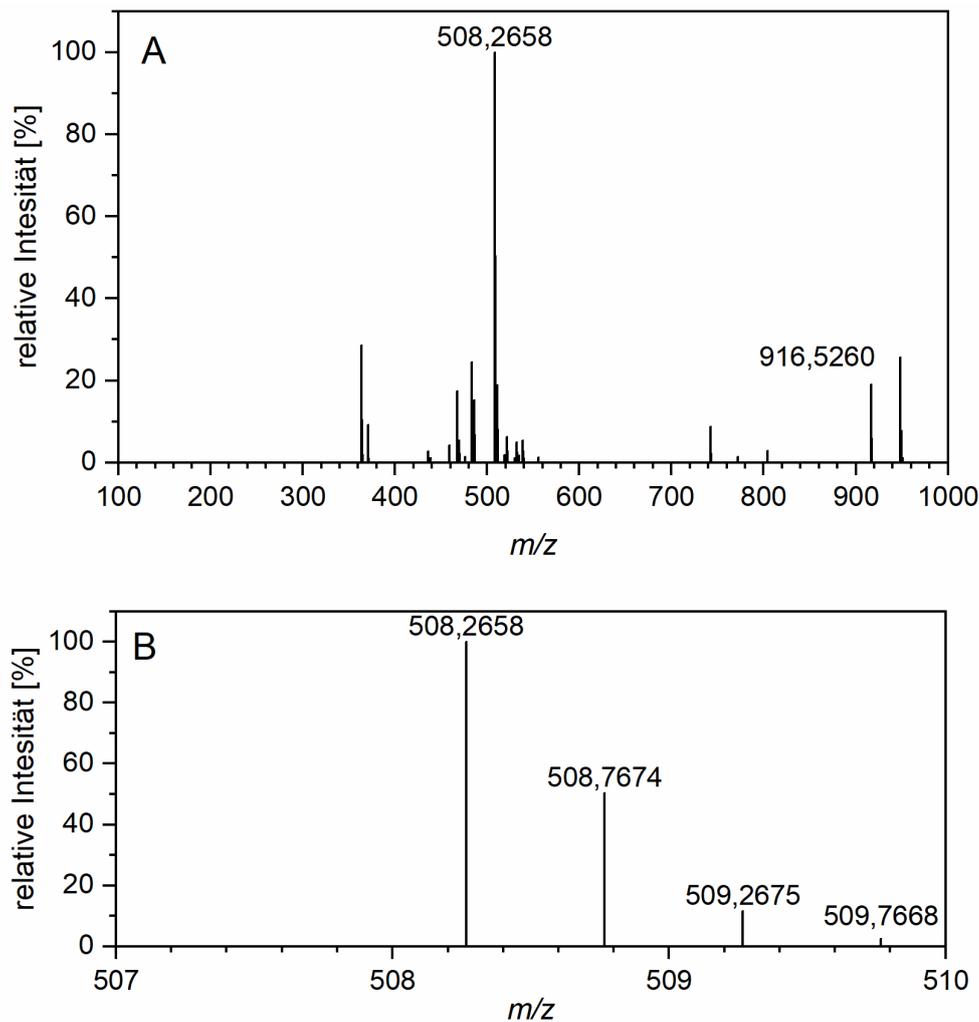


Abbildung 4.34: Full Scan der isolierten Fraktion des TP1 von TYL A mittels ESI⁺-TOF-MS; **A**) Aufnahme der m/z -Verhältnisse von 100 bis 1000 und **B**) Ausschnitt der m/z -Verhältnisse von 507 – 510, Isotopenmuster des Hauptsignals von A (m/z -Verhältnis von 508,2658).

Im Full Scan der isolierten TP1-Fraktion der HR-MS-Messung war deutlich ein m/z -Verhältnis von 508,2658 und von TYL A ein m/z -Verhältnis von 916,5260 erkennbar (Abbildung 4.34 A). Dass TYL A nach dem Isolieren im Full Scan des TP zu detektieren war, war kein unerwartetes Ergebnis, da aus den Voruntersuchungen bekannt war, dass TP1 zu TYL A zurückreagiert (Kapitel 4.5.2). Das Signal bei 508,2658 ließ sich aus dem Isotopenmuster auf ein doppelt geladenes m/z -Verhältnis zurückführen (Abbildung 4.34 B). Als Addukt für dieses m/z -Verhältnis wurde von der Software PeakView2.2 $[M+H+NH_4]^{2+}$ vorgeschlagen. Das einfach protonierte Addukt weist somit ein m/z -Verhältnis von 998,49108 auf. Dies konnte mit geringen Anteilen auch detektiert werden. In Tabelle 4.22 sind die weiteren potenziellen Addukte und deren Anteil im Spektrum dargestellt.

Tabelle 4.22: Von PeakView2.2 vorgeschlagene weitere Adduktionen zu m/z -Verhältnis von 508,2658 für TP1 von TYL A sowie deren Anteil am Spektrum.

m/z	Adduktion	Anteil [%]
508,2658	$[M+H+NH_4]^{2+}$	100
510,7434	$[M+H+Na]^{2+}$	26,4
521,7335	$[M+2Na]^{2+}$	7,1
998,4911	$[M+H]^+$	0,3
1020,4700	$[M+Na]^+$	0,1

Nach Ermittlung des exakten m/z -Verhältnisses konnte eine Summenformel ermittelt werden (Ausführungen in Kapitel 4.5.3.3).

4.5.3.2 TP2 und weitere Ergebnisse

In der Fraktion von TP2 konnte im Full Scan mittels Direktinjektion durch ESI⁺-TOF-MS kein m/z -Verhältnis eindeutig zugeordnet werden, weshalb eine LC-MS-Messung von einer TP-angereicherten Probe vorgenommen wurde.

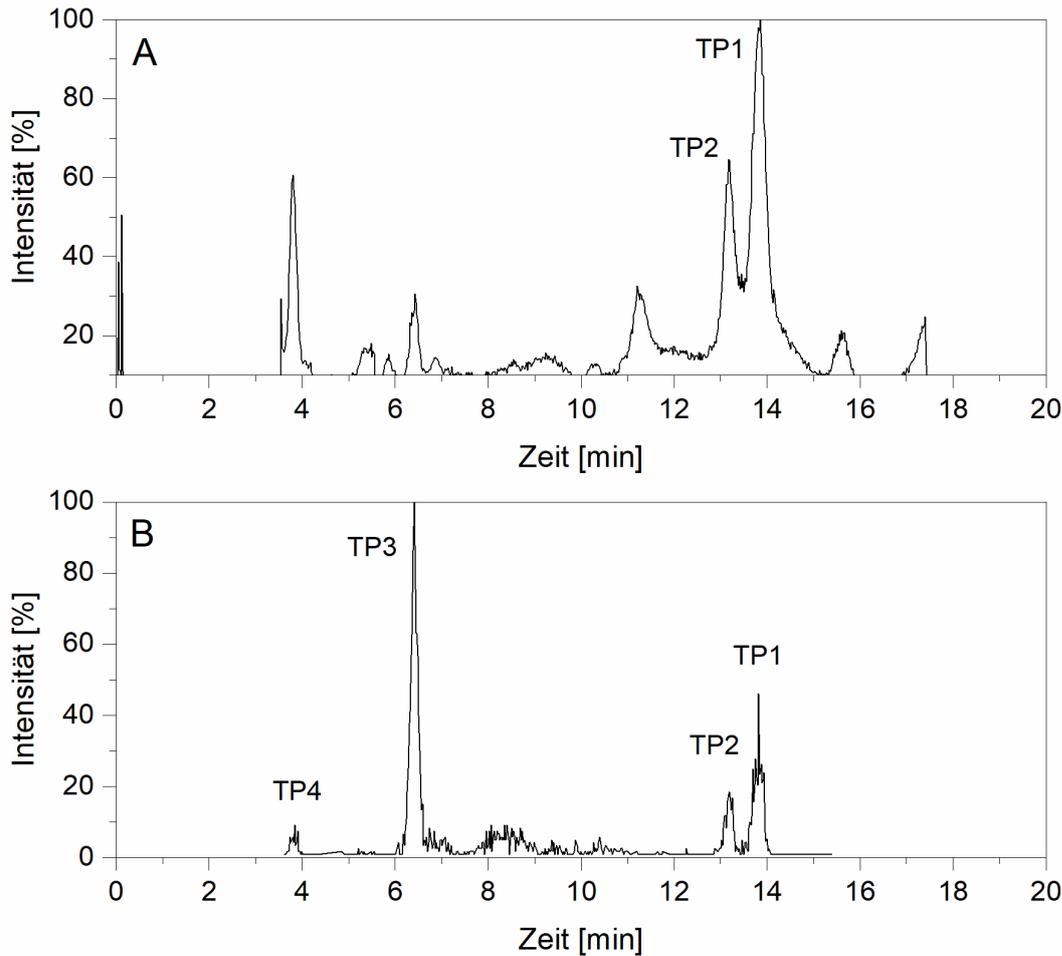


Abbildung 4.35: LC-MS-Analyse der TP-angereicherten Probe mittels LC-QTRAP; **A**) Chromatogrammausschnitt; ab 17,5 min erfolgte keine Datenaufnahme wegen der hohen Intensität von TYL A; **B**) XIC von A mit m/z -Verhältnis von 998,2 (m/z -Verhältnis von TP1, Kapitel 4.5.3.1).

Im Chromatogramm der TP-angereicherten Probe waren neben TP1 und TP2 noch weitere Peaks detektierbar (Abbildung 4.35 A). Im extrahierten Ionen-Chromatogramm (extracted ion chromatogram, XIC) des m/z -Verhältnisses von 998 erschien dieses m/z -Verhältnis nicht nur bei der Retentionszeit von TP1, sondern auch bei der Retentionszeit von TP2 (Abbildung 4.35 B). Zusätzlich wurden bei 6,5 min ein weiterer deutlicher Peak und bei 3,8 min ein kleinerer Peak mit diesem m/z -Verhältnis detektiert, die nicht im UV-Chromatogramm zu sehen waren (TP3 und TP4). Somit konnten neben den zwei Transformationsprodukten von TYL A durch die HPLC-UV (TP1 und TP2) in der LC-MS noch zwei weitere Produkte (TP3 und TP4) mit dem gleichen m/z -Verhältnis detektiert werden. Daraufhin wurde in einer Modellbiofilmprobe vom letzten Versuchstag eine LC-MS-Messung durchgeführt. Dabei wurden TP3 und TP4 nicht nachgewiesen. Offensichtlich werden die beiden Transformationsprodukte nicht während des Versuchszeitraums innerhalb von 7 Tagen (Kapitel 4.4.2.2) gebildet.

4.5.3.3 HR-MS-Messungen und Fragmentierungsmuster der Transformationsprodukte von TYL A

Die beiden Transformationsprodukte TP3 und 4 konnten bei 280 nm mittels HPLC-UV nicht detektiert werden. Durch Strukturumwandlung oder Veränderungen am Molekül kann sich das Absorptionsspektrum von Produkten verändern. Dies konnte für verschiedene Tylosin-Derivate nachgewiesen werden (J. Werner *et al.*, 2007). Bei weiteren Versuchen mittels HPLC-UV konnten bei 260 nm kleine Peaks im vorderen Chromatogrammbereich nachgewiesen werden. Während der Fraktionierung von TP1 und TP2 wurden diese Peaks separat aufgefangen und für weitere hochauflösende MS-Messungen verwendet. In der folgenden Tabelle 4.23 sind die Ergebnisse für alle vier Transformationsprodukte der LC-MS-Messung sowie die hochauflösenden MS-Messungen mit positiver und negativer Ionisation zusammengefasst.

Tabelle 4.23: Übersicht der MS-Ergebnisse von verschiedenen TP von TYL A.

TP	Intensivstes m/z -Verhältnis im positiven LC-MS-Modus	Retentionszeit LC-MS [min]	Intensivstes m/z -Verhältnis ESI ⁺ -HR-MS	Intensivstes m/z -Verhältnis ESI ⁻ -HR-MS ¹
TP1	998,2/508,2	13,8	508,2658	996,4839
TP2	998,2/521,7	13,1	508,2668	996,4839
TP3	998,3/510,7	6,4	508,2664	996,4839
TP4	998,3/510,7 ²	3,8	508,2670	- ³

¹ Full Scan und Fragmentierungsspektren s. Anhang 7.3.

² Dieses Ergebnis resultierte aus einer TP-angereicherten Probe und nicht aus einer isolierten Fraktion.

³ Die Substanzmenge reichte für eine zusätzliche HR-MS-Messung im negativen Modus nicht aus.

Es konnte gezeigt werden, dass es vier Transformationsprodukte von TYL A gibt, die durch einen Biofilm aus *P. fluorescens* gebildet wurden, die das gleiche m/z -Verhältnis besitzen und zu unterschiedlichen Retentionszeiten eluierten.

Beim Vergleich der Fragmentierungsmuster der 4 TP von TYL A konnten Unterschiede festgestellt werden (Abbildung 4.36). TP1 und TP2 besaßen ein ähnliches Spektrum, wobei deutlich das m/z -Verhältnis von TYL A (916) als Hauptfragment detektiert wurde. Somit wurde hier eine durch den Biofilm eingeführte unbekannte Gruppe (Konjugationsgruppe) direkt wieder abgespalten (Tabelle 4.24). Das zweitgrößte Fragment war das m/z -Verhältnis von 772, das nach Abspaltung der Konjugationsgruppe und Mycarose entstehen konnte und TYL B entsprach. Danach folgte das Fragment mit einem m/z -Verhältnis von 598, das zusätzlich zum Verlust der Konjugationsgruppe die Abspaltung der Zucker Mycarose und Mycinose bedeutete.

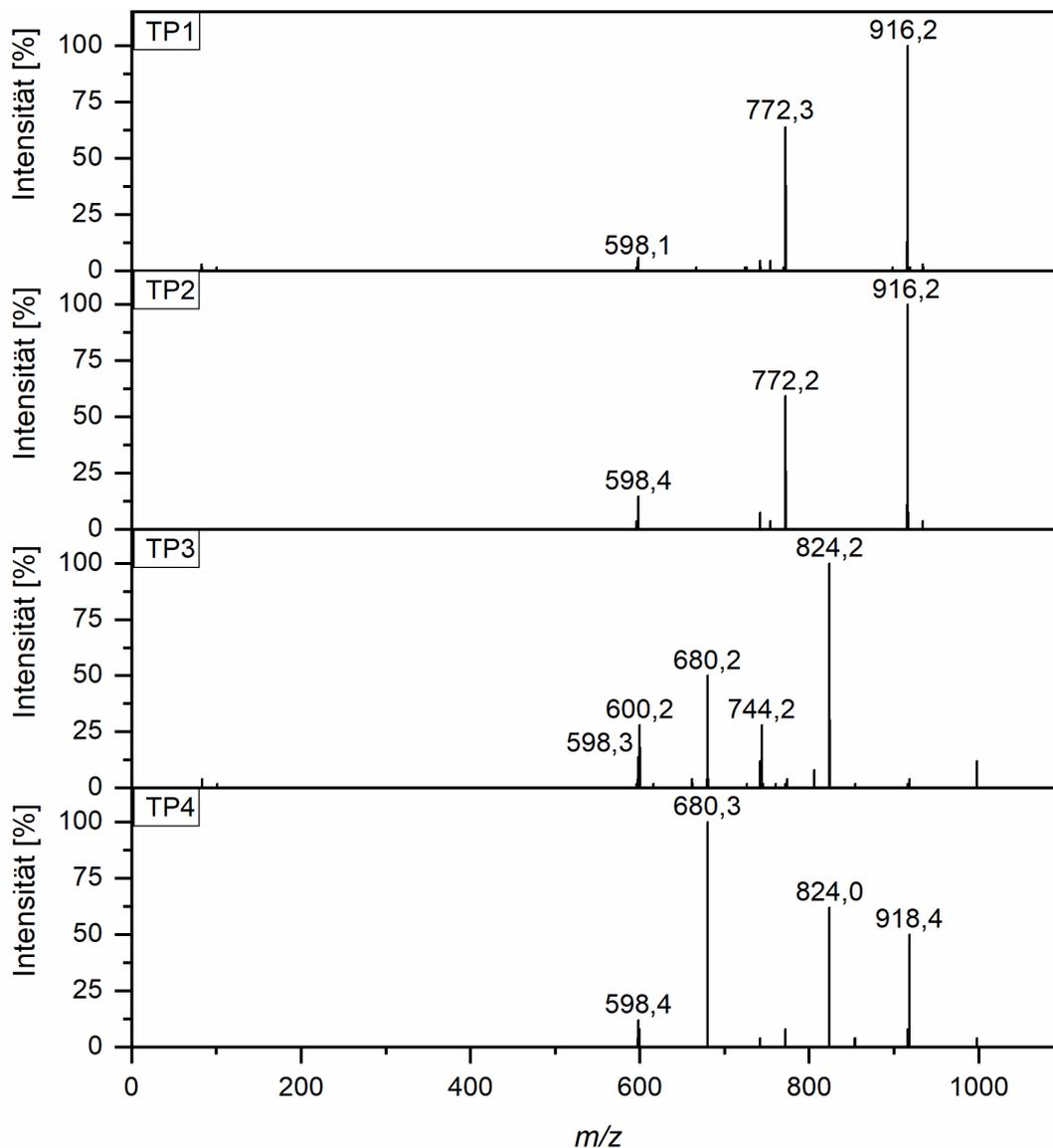


Abbildung 4.36: Fragmentierungsspektren von TP1 bis TP4 von TYL A (m/z -Verhältnis von 998,5, CE 50 V) mittels LC-MS/MS.

Im Vergleich zu TP1 und TP2 unterschieden sich die Fragmentierungsmuster von TP3 und TP4. Bei beiden war TYL A als Fragment kaum erkennbar. Ein intensives Fragment war das m/z -Verhältnis von 824, das durch eine direkte Abspaltung der Mycinoase vom TP entstehen könnte, ohne eine vorherige Abspaltung der Konjugationsgruppe. Das Fragment mit einem m/z -Verhältnis von 680 deutete auf eine zusätzliche Abspaltung der Mycarose vom Fragment m/z -Verhältnis von 824. Bei beiden war dabei die Konjugationsgruppe noch enthalten. Das heißt, an den Zuckern Mycinoase und Mycarose wurde TYL A bei TP3 und TP4 nicht transformiert. Interessant ist auch das Fragment 918 von TP4, das nur bei diesem TP detektiert werden konnte und TYL D entspricht.

Tabelle 4.24: Übersicht über die Fragmente der TP von TYL A mit möglichen Fragmentierungswegen.

Fragment <i>m/z</i> -Verhältnis	Substanz	Abspaltungsgruppe	Detektion bei TP
934		998 – 64	1,2
918	Tylosin D	998 – 80	4
916	Tylosin A	998 – 82	1,2
824	DMT ¹ + 82	998 – Mycinose	3,4
772	Tylosin B	998 – 82 - Mycarose	1,2
744	DMT ¹ + 2H	998 – Mycinose - 80	3
742	DMT ¹	998 – Mycinose - 82	1,2,4
680	OMT ² + 82	998 - Mycinose – Mycarose	3,4
600	OMT ² + 2H	998 – Mycinose – Mycarose -80	3,4
598	OMT ²	998 – Mycinose – Mycarose -82	1,2,3,4

¹ DMT: Demycinosyltylosin, ² OMT: 5-O-Mycaminosyltylonolid

In den negativen Fragmentierungsmustern unterscheiden sich die TP1 bis 3 nicht von TYL A nach Abspaltung der Transformationsgruppe (Anhang 7.3). Die Messung von TP4 konnte auf Grund der geringen Substanzmenge nicht durchgeführt werden. Somit können aus der HR-MS-Messung im negativen Modus keine weiteren Erkenntnisse gewonnen werden.

4.5.3.4 Ermittlung einer Summenformel und Diskussion

Aus den Ergebnissen einer hochauflösenden MS-Messung kann die Summenformel eines Moleküls abgeleitet werden. Im Fall von TP1 wurde das *m/z*-Verhältnis von 508,2664 ausgewählt. Zusätzlich wurde angegeben, dass das gegebene *m/z*-Verhältnis doppelt positiv geladen war ($[M+H+NH_4]^{2+}$). Als Mindestvorgabe hinsichtlich der Elementzusammensetzung wurden neben der Summenformel von TYL A (C₄₆H₇₇NO₁₇) Schwefel und Phosphor als mögliche Elemente mit in die Suche eingefügt. Ersteres wurde ausgewählt, da sich TP1 in TYL A wieder umwandeln kann. Schwefel und Phosphor sind als Elemente in Konjugationsgruppen von Bakterien bekannt (Malojčić *et al.*, 2008; Wright, 2005). In Tabelle 4.25 sind die mittels PeakView2.2 ermittelten Vorschläge bis zu einer Abweichung von ±10 ppm aufgeführt.

Tabelle 4.25: Per ESI⁺-TOF-MS ermitteltes m/z -Verhältnis und die durch PeakView vorgeschlagenen Summenformeln für TP1 von TYL A sowie exakte Massen, Abweichungen und Doppelbindungsäquivalenten (DBÄ).

Summenformel	m/z -Verhältnis	DBÄ	Abweichung [ppm] zu 508,26581	Summenformel-Unterschied zu TYL A (C ₄₆ H ₇₇ NO ₁₇)
C ₄₆ H ₇₉ NO ₂₀ S	508,26636	7	-0,7	H ₂ O ₃ S
C ₄₆ H ₈₀ NO ₁₈ PS	508,26224	7	7,4	H ₃ O P S
C ₄₆ H ₈₀ NO ₂₀ P	508,27112	7	-10,4	H ₃ O ₃ P

Die in Tabelle 4.25 aufgezeigten Vorschläge für die Summenformel beinhalten eine Sulfonierung (Abweichung - 0,7 ppm), eine Phosphorylierung (- 10,4 ppm) sowie ein Einfügen von Schwefel als auch Phosphor in das Molekül (H₃OPS, 7,4 ppm). Die letztgenannte Variante ist eher untypisch für Transformationsreaktionen.

Tabelle 4.26: Per ESI⁺-TOF-MS ermittelte m/z -Verhältnis von 996,4839 und die durch ChemCalc* vorgeschlagenen Summenformeln für TP1 von TYL A sowie exakte Massen und Abweichungen (Durchführung der Messung durch das Institut für Organische Chemie, Dr. Raffael Wende)

Summenformel	m/z -Verhältnis	Abweichung [ppm] zu 996,4839	Summenformel-Unterschied zu TYL A (C ₄₆ H ₇₇ NO ₁₇)
C ₄₆ H ₇₉ NO ₂₀ S	996,4843	-0,4	H ₂ O ₃ S
C ₄₆ H ₈₀ NO ₁₈ PS	996,4761	7,8	H ₃ O P S
C ₄₆ H ₈₀ NO ₂₀ P	996,4939	-10,0	H ₃ O ₃ P

* ChemCalc.org, Aufruf am 02.09.2021.

Nach der Ermittlung der exakten m/z -Verhältnis im negativen Modus ergaben sich die gleichen Summenformelvorschläge wie im positiven Modus (Tabelle 4.26). Das TP1 konnte ohne weitere Nebenprodukte schnell zu TYL A zurückreagieren. Dies spricht für das Einfügen einer funktionellen Gruppe an TYL A, die durch äußere Einflüsse wieder leicht abgespalten werden kann. Für diese Annahme sprechen auch die Massenspektren von TP1 und TP2, die als Fragment das Molekülion von TYL A aufwiesen (m/z -Verhältnis von 916 im positiven, Abbildung 4.36) oder sich in ihrem Fragmentierungsmuster nicht von TYL A unterschieden (im negativen Modus: Abbildung 7.6 und Abbildung 7.7). Durch die Reversibilität von TP1 zu TYL A konnte darauf geschlossen werden, dass keine weiteren strukturellen Veränderungen am Molekül während der Transformation abliefen. Somit konnte eine Ringspaltung durch eine Makrolid-Esterase ausgeschlossen werden (Barthélémy *et al.*, 1984; Y.-H. Kim *et al.*, 2002).

Bekannte Transformationsreaktionen durch Bakterien sind zum Beispiel die Acetylierung, Glycosylierung, Nukleotidierung und Phosphorylierung (Nadeem *et al.*, 2020; Terzic *et al.*, 2011; Wright, 2005). Die ersten drei genannten Transformationen können durch die stark abweichenden Summenformeln ausgeschlossen werden. Eine Transformation wie die Phosphorylierung konnte bei klinischen Stämmen von *Staphylococcus aureus*, *E. coli* und *P. aeruginosa* für Makrolide nachgewiesen werden (Kono *et al.*, 1992; Matsuoka *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2000). Durch ein aus *Streptomyces coelilor* isoliertes Enzym wurde TYL A zu Tylosin-2'-Phosphat umgewandelt, wobei die Hydroxygruppe des Aminozuckers phosphoryliert wird und die Summenformel $C_{46}H_{78}NO_{17}P$ entsteht. (V. P. Marshall *et al.*, 1989; Wiley *et al.*, 1987). Dies sind zwei Wasserstoffatome weniger als der für die TP ermittelte Vorschlag. Das typische Fragment von phosphorylierten Makroliden ist im positiven Modus der Massenverlust der Phosphatgruppe von 80 (Terzic *et al.*, 2011). Für TP1, 2 und 3 wurde dieser Neutralverlust von 80 nicht detektiert. Nur für das TP4 konnte im positiven Modus das Fragment m/z -Verhältnis von 918 nachgewiesen werden, das einem Massenverlust von 80 entspricht (Abbildung 4.36).

Für eine vollständige Strukturaufklärung von TP werden normalerweise NMR-Experimente (1H -, ^{13}C -NMR und 2D-NMR-Experimente) durchgeführt. Diese konnten hier aufgrund der geringen Substanzmenge verbunden mit der Labilität der Verbindungen nicht durchgeführt werden. Da die vorgeschlagenen Summenformeln Schwefel oder Phosphor enthielten, wurden TP1 und TP2 mittels angepasster analytischer HPLC isoliert, die Fraktionen eingengt und in D_2O aufgenommen und anschließend eine ^{31}P -NMR-Messung durchgeführt. Dabei konnte nach einer Langzeitmessung kein Signal für Phosphor detektiert werden. Die Produkte sind zwar instabil, aber wenn Phosphor enthalten wäre, müsste man ein Signal im NMR entweder durch das Vorkommen von Phosphor im Molekül selbst oder von einer abgespaltenen Phosphatgruppe im Lösungsmittel erhalten. Aus diesem Grund konnte die Phosphorylierung ausgeschlossen werden.

Schwefel konnte leider auf diesem Weg nicht bestätigt werden, da bei Schwefel nur das ^{33}S -Isotop mit einem Spin von $3/2$ zur NMR-Spektroskopie in Frage kommt (Stedel, 2014). Dieses hat einen Quadrupolkern, der zu extremer Signalverbreiterung führt, und ist mit einer natürlichen Häufigkeit von 0,76 % sehr gering enthalten. Insofern kam dieses Isotop für eine NMR-spektroskopische Untersuchung nicht in Betracht (Bienz *et al.*, 2016; Stedel, 2014).

4.5.3.4.1 Möglichkeit der Sulfonierung

Der Summenformelvorschlag mit der geringsten Abweichung suggeriert eine Sulfonierung. Sulfotransferasen (SULT) sind in Bakterien weniger erforscht (Malojčić *et al.*, 2008). Gewisse Erkenntnisse liegen zu 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat-(PAPS)-abhängigen SULT und zu PAPS-unabhängigen Aryl-Sulfotransferasen vor (Van Lanen, 2013). Eine Sulfonierung selbst wurde bei Makroliden bzw. Tylosin bisher nicht nachgewiesen. Sulfonierungen von Xenobiotika konnten unter anderem für das Antibiotikum Amoxicillin durch die Aryl-Sulfotransferase des

Eubacterium A-44 (Dong-Hyun Kim *et al.*, 1992) sowie von Parabenen und Tyrosylpeptiden (Dong-Hyan Kim *et al.*, 1994) nachgewiesen werden. Bei diesem Enzym wird die Sulfongruppe nur auf phenolische Einheiten übertragen, die in Tylosin allerdings nicht enthalten sind. Auch für Glykopeptide konnte eine Sulfonierung an einer phenolischen Einheit unter Umweltbedingungen nachgewiesen werden. Hierbei hatte die Modifizierung keinen Einfluss auf die antimikrobiologische Aktivität (Kalan *et al.*, 2013).

Bei diesen Enzymsystemen werden SO_3 -Gruppen übertragen und nicht, wie bei der hier vorgeschlagenen Summenformel, H_2SO_3 . Somit fehlten auch bei der Sulfonierung wie bei der oben beschriebenen Phosphorylierungsmöglichkeit zwei Wasserstoffatome in der Summenformel. Eine Reduktion einer Aldehyd-Gruppe zusätzlich zur Sulfonierung könnte den Zusatz von H_2SO_3 erklären. Dies würde eine Transformation in zwei Schritten bedeuten, dass ein Zwischenprodukt als reduktives oder sulfoniertes TYL A beinhalten würde. Da kein Peak detektiert werden konnte, der im UV-Chromatogramm oder im TIC ebenfalls im Zeitraum stieg, kommt nur ein Enzymsystem in Frage, das beide Modifikationen durchführt. Die Sulfotransferasen sind bisher in Bakterien wenig erforscht und es ist bisher kein Enzymsystem für beide Mechanismen beschrieben. Somit können die Vermutungen nicht untermauert werden. Ein zweistufiges Enzymsystem wurde vom grampositiven Bakterium *Nocardia asteroides* beschrieben, wobei TYL A gleichzeitig an C20 reduziert und an der freien Hydroxyzuckergruppe des Aminozuckers glykosyliert wurde (Morisaki *et al.*, 2001). Demnach gibt es zweistufige Enzymsysteme für Makrolide, die eine Reduktion und Übertragung einer Gruppe beinhalten.

4.5.3.4.2 Isotopenmuster

In der Massenspektroskopie kann der Nachweis von Schwefel über das typische Isotopenmuster erfolgen. Schwefel weist neben dem ^{32}S -Isotop das ^{34}S -Isotop mit einer relativen Häufigkeit von 4,5 % auf (Gross, 2019). Bei der Berechnung des Isotopenmuster wurden die Isotopenverteilungen der ebenfalls enthaltenen Elemente (C, H, N, O) mitberücksichtigt (Tabelle 4.27).

Tabelle 4.27: Isotopenmuster von TP1 mittels ESI⁺-TOF-MS des m/z -Verhältnisses von 508,2658 im Vergleich zu den berechneten Isotopenmustern der zwei Transformationsvorschläge.

Isotop von TP	Gemessen	Vorschlag *	Vorschlag *
		$\text{C}_{46}\text{H}_{79}\text{NO}_{20}\text{S}$	$\text{C}_{46}\text{H}_{80}\text{NO}_{20}\text{P}$
M	100	100	100
M+1	53,4	53,1	52,3
M+2	14,0	22,4	17,5
M+3	3,3	6,8	4,4

*berechnet envipat.eawag.ch (Loos *et al.*, 2015)

Die Anteile von M+2 wichen bei beiden Vorschlägen von dem gemessenen Isotopenanteil ab. Das Isotopenmuster von TYL A wurde dann ebenfalls mit dem berechneten und dem gemessenen verglichen (Tabelle 4.28).

Tabelle 4.28: Gemessenes und berechnetes Isotopenmuster von TYL A an ESI+-TOF-MS.

Isotop von TYL A	Gemessen	Berechnet*
M	100	100
M+1	40,8	51,7
M+2	9,4	16,6
M+3	0,8	4,0

*berechnet envipat.eawag.ch (Loos *et al.*, 2015)

Auch das gemessene Isotopenmuster von TYL A passte nicht mit dem berechneten überein. Somit konnte das Isotopenmuster weder für einen Schwefel-Nachweis noch für seine Abwesenheit herangezogen werden. Bei der Summenformelsuche mit PeakView konnte das Isotopenmuster zusätzlich mit in die Suche aufgenommen werden. Dabei wurde dennoch die Schwefelverbindung als das wahrscheinlichste angegeben. Das bedeutet, die erhaltenen Isotopenmuster sind weniger spezifisch und eine Transformation unter Beteiligung von Schwefel kann weder ausgeschlossen noch bestätigt werden. Somit konnten die anderen Transformationsvorschläge ebenfalls nicht über Isotopenmuster ausgeschlossen werden.

4.5.3.4.3 Typische Fragmentierungsmuster von Sulfongruppen

Die Fragmentierungsmuster der TP zeigten, dass die Transformation nicht an den zwei äußeren Zuckerresten (Mycarose und Mycinose) stattfand (Abbildung 4.36). Auch durch die saure Hydrolyse von TP1 (Abbildung 4.32) wurde ersichtlich, dass die beiden Zucker nicht modifiziert wurden. Somit bleiben für eine Modifikation der Laktoneinheit und der Mycaminose-Zucker übrig. Bisher konnten an der freien Hydroxy-Gruppe des Mycaminose-Zuckers die Glykosylierung und Phosphorylierung nachgewiesen werden (Morisaki *et al.*, 2001; Nakamura *et al.*, 2000). Die Hydroxygruppe am C3 in unmittelbarer Nachbarschaft der Laktoneinheit kann durch eine Acetylierung mikrobiell modifiziert werden (Okamoto *et al.*, 1980). Am Laktoneinheit konnte die Reduktion des C20-Aldehyds zur Bildung von TYL D nachgewiesen werden (Hu & Coats, 2007).

Da Sulfonierungen für Makrolide nicht bekannt sind, wurde beim Vergleich der Fragmentierungsmuster auf bekannte Fragmente von Sulfongruppen zurückgegriffen. Yi *et al.* (2006) zeigten auf, dass das Fragmentierungsmuster von sulfonierten Substanzen im negativen Messmodus stark davon abhängt, welche Stelle am Molekül sulfoniert ist. Das Fragment mit einem m/z -Verhältnis von 96 wurde bei Benzyl- oder Allylalkoholen und aromatischen Hydroxylaminen detektiert. Bei

bestimmten aliphatischen Alkoholen konnte ein m/z -Verhältnis von 97 nachgewiesen werden. Das Fragment $[M-80-H]^+$ nach einem Massenverlust von 80 wurde vor allem bei Phenolen und Enolen detektiert. Und wenn nur das m/z -Verhältnis von 80 und keine der oben genannten Fragmente vorhanden war, handelte es sich um Amine. Bei den TP konnten die m/z -Verhältnisse von 80, 96 oder 97 bei den durchgeführten Messungen nicht detektiert werden. Bei TP 1 bis 3 konnte ein Fragment von m/z -Verhältnis 80,9657 im negativen Modus detektiert werden (Anhang 7.3). Dieses Fragment konnten Hsu *et al.* (2008) als zusätzliches Fragment für sulfonierte Steroide mit HSO_3^- (m/z -Verhältnis von 80.9651) nachweisen. In der Veröffentlichung von Yi *et al.* (2006) konnte bei dem Massenspektrum für einen aliphatischen Alkohol (Beispiel: Glucose-6-Sulfat) zusätzlich das m/z -Verhältnis von 81 in geringer Intensität detektiert werden. Durch eine 1,3-Verschiebung des Wasserstoffs kann das Fragment von HSO_3^- gebildet werden (Hsu *et al.*, 2008). Dabei ähnelt die sulfonierte Stelle der Steroide den aliphatischen Alkoholen, bei denen das charakteristische Fragment nach Yi *et al.* (2006) das m/z -Verhältnis von 97 ist. Das m/z -Verhältnis 97 beruht auf der Bildung einer Doppelbindung. Dieser Weg ist durch die besondere und komplexe Struktur von TYL A nicht möglich, sodass das m/z -Verhältnis von 97 nicht und eher m/z -Verhältnis 81 gebildet wird.

Der Neutralverlust von 82 im Fragmentierungsmuster, das für H_2SO_3 stehen könnte, ist bisher als Fragmentgruppe nicht beschrieben. Die folgende Theorie könnte eine Erklärung liefern. Dabei wird von einer Sulfongruppe am C3 in unmittelbarer Nachbarschaft der Laktongruppe und einer reduzierten Aldehyd-Gruppe an C20, die auf der gleichen sterischen Seite stehen, ausgegangen. TYL A könnte durch den abgebildeten Mechanismus nach dem Neutralverlust von H_2SO_3 als Fragment entstehen und im Massenspektrum auftreten (Abbildung 4.37).

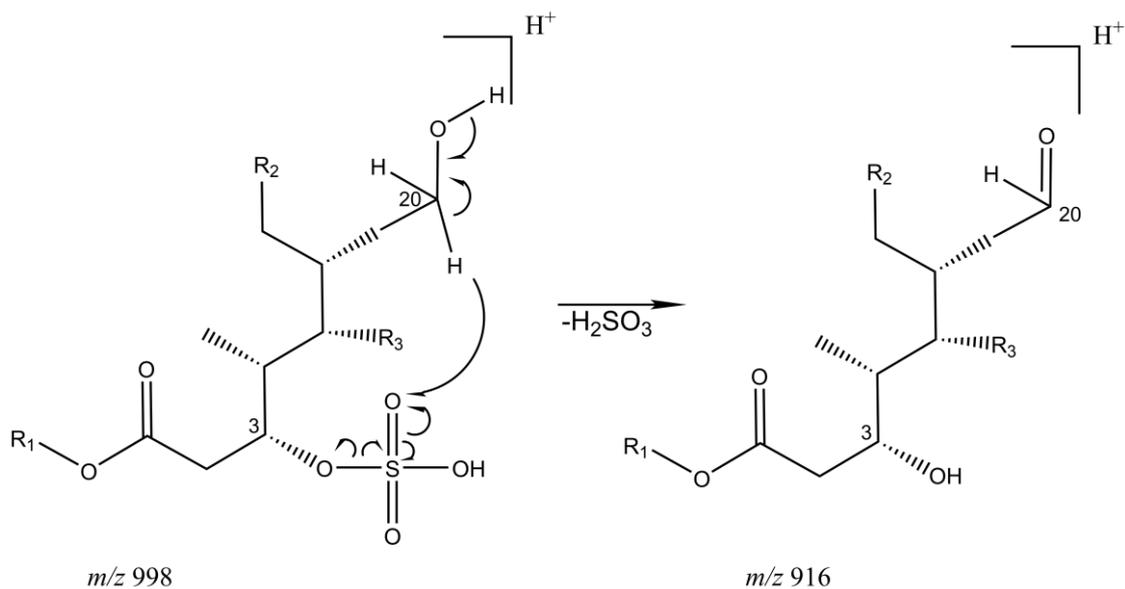


Abbildung 4.37: Möglicher Reaktionsweg zum Neutralverlust von H_2SO_3 bei der Fragmentierung von TP1, das durch eine reduktive Sulfonierung von TYL A entstehen könnte. R_1 und R_2 sind Reste des Laktonrings und R_3 des Disaccharids (s. Abbildung 3.5).

TYL A als Fragment konnte bei TP1 und 2 eindeutig detektiert werden, bei TP3 nur in sehr geringer Intensität und bei TP4 dafür das Fragment 918, das für einen Neutralverlust von 80 steht. Dies entspricht dem typischen Fragment einer SO_3 -Gruppe bei einem TP, das sulfoniert wurde (Yi *et al.*, 2006). Eine Erklärung für die unterschiedlichen Fragmente von TP4 wäre, dass die beiden Modifikationsstellen bei diesem TP sterisch nicht auf einer Seite stehen und somit die typische Sulfongruppenabspaltung detektiert werden konnten. Dabei können die TP keine Enantiomere sein, da man sie nicht auf der verwendeten HPLC trennen könnte. Diastereomere, die sich somit in mindestens einem Stereozentrum unterscheiden, wären möglich.

Insofern bleibt festzuhalten, dass die TP nicht eindeutig identifiziert werden können. Es deuten einige Indizien auf eine reduktive Sulfonierung hin (geringste Abweichung in der Summenformel, Erklärung des Fragment m/z -Verhältnis von 81). Das deutliche und ungewöhnliche Fragment mit m/z -Verhältnis von 82 könnte durch gleiche sterische Seiten der Sulfongruppe und der reduzierten Aldehydgruppe erklärt werden. Gegen eine reduktive Sulfonierung spricht, dass sie bisher noch nicht beschrieben wurde, das Fehlen der Fragmente 80 (außer für TP4) sowie das Isotopenmuster.

4.5.4 Zusammenfassung und Ausblick

Es konnten für TYL A vier Transformationsprodukte mit dem gleichen m/z -Verhältnis von 998,5 nachgewiesen werden. In einem Zeitraum von 7 Tagen des Biofilmversuchs (Kapitel 4.4.2.2) entstanden nur TP1 und TP2. TP3 und 4 konnten erst nach Anreicherung über einen längeren Zeitraum von 3 Wochen detektiert werden. Es wurden Stabilitätsuntersuchungen von TP1 und 2 in einer TP-angereicherten sterilen Biofilmprobe durchgeführt, die noch alle TYL-Derivate enthielt. Dabei konnte festgestellt werden, dass TP1 und 2 in Wasser am stabilsten waren und in den säurehaltigen Lösungen langsam zu TYL A und B umgewandelt wurden. Ebenfalls konnte bei TP1 ein Peak mit der Abspaltung der Mycarose-Gruppe per LC-MS nachgewiesen werden, dies könnte für eine saure Hydrolyse sprechen. In Methanol, ACN und Natriumhydroxid zeigten die TP 1 und 2 geringe Stabilitäten und eine schnelle Rückbildung zu TYL A, das beim Isolieren mittels HPLC zu Schwierigkeiten führte.

Die Ermittlung der Summenformel mittels HR-MS ergab eine Transformation mit einem Schwefel und/oder Phosphor-Atom. Mittels ^{31}P -NMR-Messung konnte eine Phosphorylierung ausgeschlossen werden. Es sprechen viele Indizien für eine reduktive Sulfonierung, wobei das typische Schwefelisotop durch das Isotopenmuster von TYL A selbst nicht nachgewiesen werden konnte. Durch die Fragmentierungsmuster konnten die beiden Zucker Mycarose und Mycinose als Transformationsstelle ausgeschlossen werden. Zum Teil kann die Theorie der reduktiven Sulfonierung mit Fragmenten im positiven sowie im negativen Messmodus erklärt werden.

Eine vollständige Strukturaufklärung mittels gängiger Aufklärungsmethoden wie NMR waren auf Grund der geringen und instabilen Substanzmengen nicht möglich.

4.6 Transformation von Sulfadiazin unter Druck und Temperatur

4.6.1 Hintergrund

Um Kreuzkontaminationen mit anderen Bakterienstämmen zu vermeiden, dürfen zum Ansetzen der Biofilmversuche nur sterile Lösungen verwendet werden. Dazu müssen alle angesetzten Lösungen am Ende des letzten Herstellungsschrittes autoklaviert werden. Bei den Vorversuchen zu Kapitel 4.3 und 4.4 wurden hierfür die Antibiotika in Minimalmedium (MM) gelöst und vor dem Befüllen des PVC-Rohres autoklaviert.

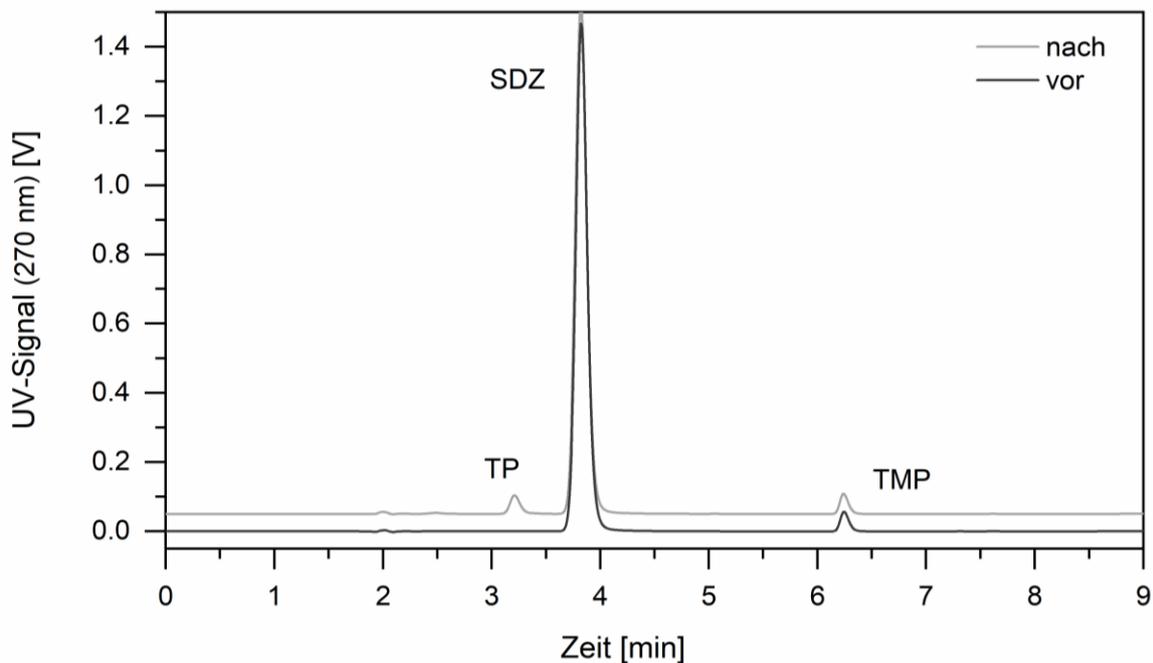


Abbildung 4.38: UV-Chromatogrammausschnitt von SDZ und TMP in MM vor und nach Autoklavieren mit Detektion eines neuen Peaks bei 3,3 min, dem Transformationsprodukt (TP).

Im UV-Chromatogramm nach Autoklavieren konnte ein zusätzlicher Peak, der vor SDZ eluierte, detektiert werden (Abbildung 4.38). Die Peakfläche bzw. Konzentration von TMP war vor und nach dem Autoklavieren gleich. Ein Verdampfen von Wasser und eine damit einhergehende Volumenänderung der Lösung können somit ausgeschlossen werden. Da der Gehalt von SDZ im Vergleich zur nicht autoklavierten Lösung um $2 \mu\text{g/mL}$ geringer war, konnte es sich nur um ein Transformationsprodukt (TP) von SDZ handeln. Da Sulfonamide als sehr stabil gelten und auch gegenüber hohen Temperaturen (ca. 200°C) in der Literatur als inert beschrieben sind (Stober & DeWitte, 1982), sollte der Einfluss des Autoklavierens auf SDZ überprüft sowie das TP identifiziert werden.

4.6.2 Identifizierung des Transformationsproduktes von SDZ

Zur Isolierung des Transformationsproduktes wurde mittels semipräparativer HPLC die Fraktion des Peaks isoliert, eingengt und der Rückstand in Methanol/Wasser für die HR-MS-Messung aufgenommen.

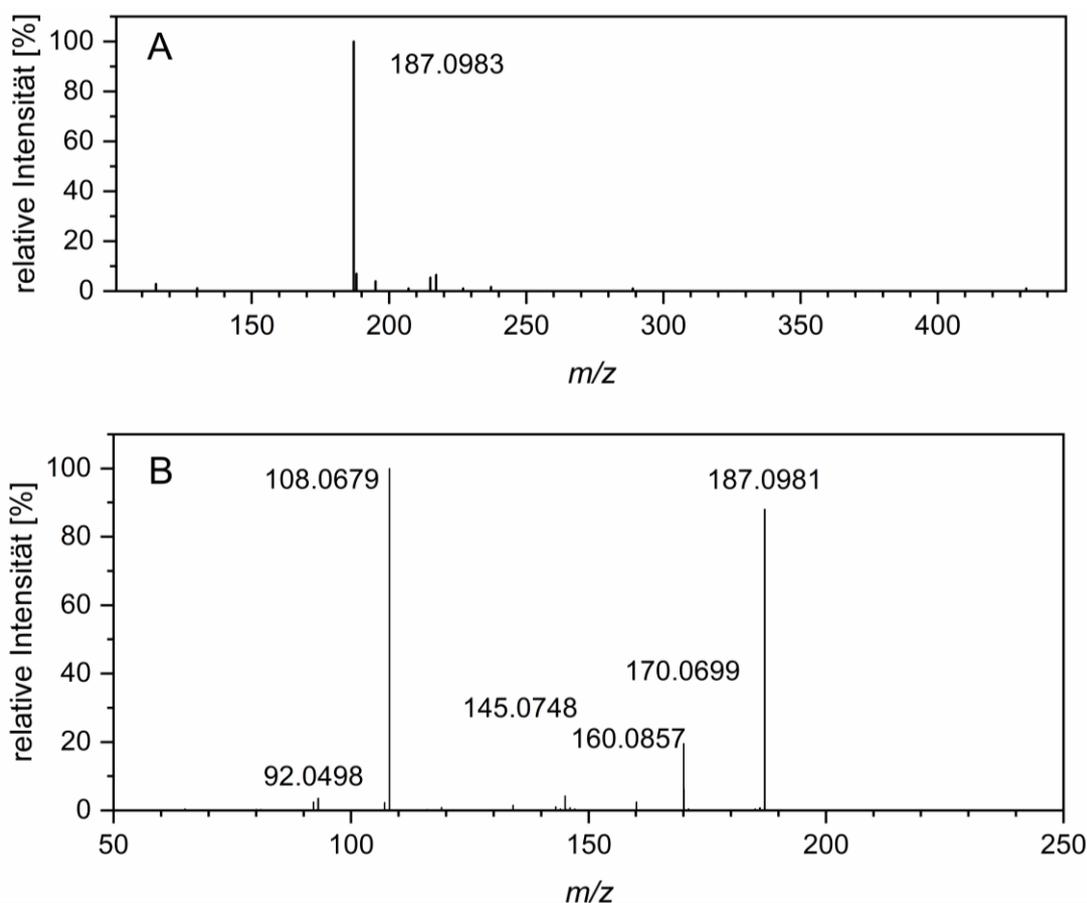


Abbildung 4.39: HR-MS-Messung mittels ESI⁺-TOF-MS der isolierten Fraktion des potenziellen Transformationsproduktes von SDZ mit **A**) Full Scan Modus und **B**) Fragmentierungsspektrum des m/z -Verhältnisses von 187,1 (CE 30 V).

Im Full Scan Modus konnte dem TP von SDZ ein m/z -Verhältnis von 187,0983 zugeordnet werden (Abbildung 4.39 A). Mittels der Software PeakView wurde eine Summenformel ermittelt (Tabelle 4.29).

Tabelle 4.29: Vorschlag einer Summenformel für TP von SDZ sowie der Fragmente mit theoretisch und experimentell ermitteltem m/z -Verhältnis sowie die berechneten Abweichungen.

Summenformel	[M+H] ⁺ (m/z -Verhältnis)		
	theoretisch	experimentell	Abweichung [ppm]
C ₁₀ H ₁₁ N ₄	187,0978	187,0983	2,5
C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S (SDZ)	251,0597	251,0609	4,7
<i>Fragmente</i>			
C ₆ H ₆ N	92,0495	92,0498	3,6
C ₆ H ₈ N ₂	108,0682	108,0679	-2,7
C ₉ H ₉ N ₂	145,0760	145,0748	-8,3
C ₉ H ₁₀ N ₃	160,0869	160,0857	-7,6
C ₁₀ H ₈ N ₃	170,0713	170,0699	-8,1

Das experimentell bestimmte m/z -Verhältnis zeigt einen Massenverlust von 64 im Vergleich zum m/z -Verhältnis von SDZ auf. Dies und die vorgeschlagene Summenformel sprechen für eine SO₂-Extrusion von SDZ, was das Fragmentierungsmuster bestätigt (Vergleich mit Periša *et al.* (2013), Sukul *et al.* (2008b) und Ji *et al.* (2017)). Sulfonamide zeigen charakteristische Fragmente bei m/z -Verhältnissen von 92, 108 und 156 (Abbildung 4.40) (Díaz-Cruz *et al.*, 2008). Die Fragmente mit m/z -Verhältnissen von 92,0498 sowie 108,0679 konnten anhand des Produktionen-Scans für TP von SDZ nachgewiesen werden (Abbildung 4.39 B, Tabelle 4.29).

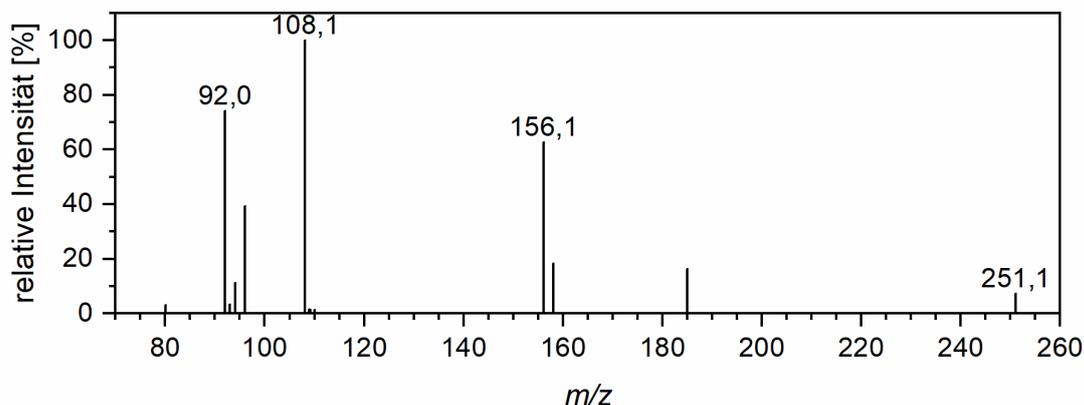


Abbildung 4.40: Fragmentierungsspektrum des m/z -Verhältnisses von 251,1 (SDZ) mittels LC-MS/MS (CE 30 V).

Das Fragment mit dem m/z -Verhältnis von 156 wurde nicht detektiert. Dieses beinhaltet die SO₂-Gruppe. Das Fehlen dieses Fragments ist eine weitere Bestätigung für die SO₂-Extrusion im Falle des TP. Periša *et al.* (2013) schlugen einen Mechanismus zur Bildung des SO₂-extrudierten SDZ (SDZ_{ex}) vor (Abbildung 4.41).

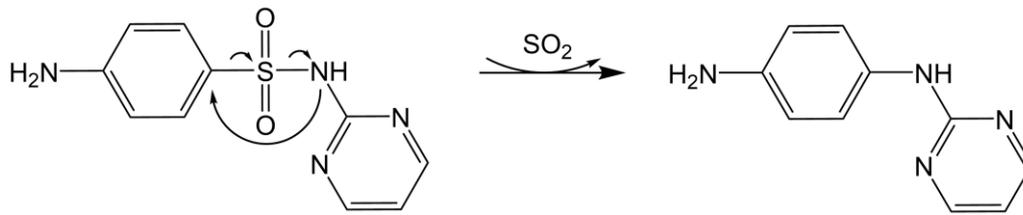


Abbildung 4.41: Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus von SDZ zu SDZ_{ex} (1-*N*-(pyrimidin-2-yl)benzen-1,4-diamin), nach Periša *et al.* (2013).

SDZ_{ex} konnte mit einer kommerziellen Referenzsubstanz von 1-*N*-(pyrimidin-2-yl)benzen-1,4-diamin mittels HPLC-UV und LC-MS verglichen werden. Dabei stimmten Retentionszeit, das UV-Spektrum und das Fragmentierungsmuster überein, sodass das TP eindeutig identifiziert werden konnte (Abbildung 4.42).

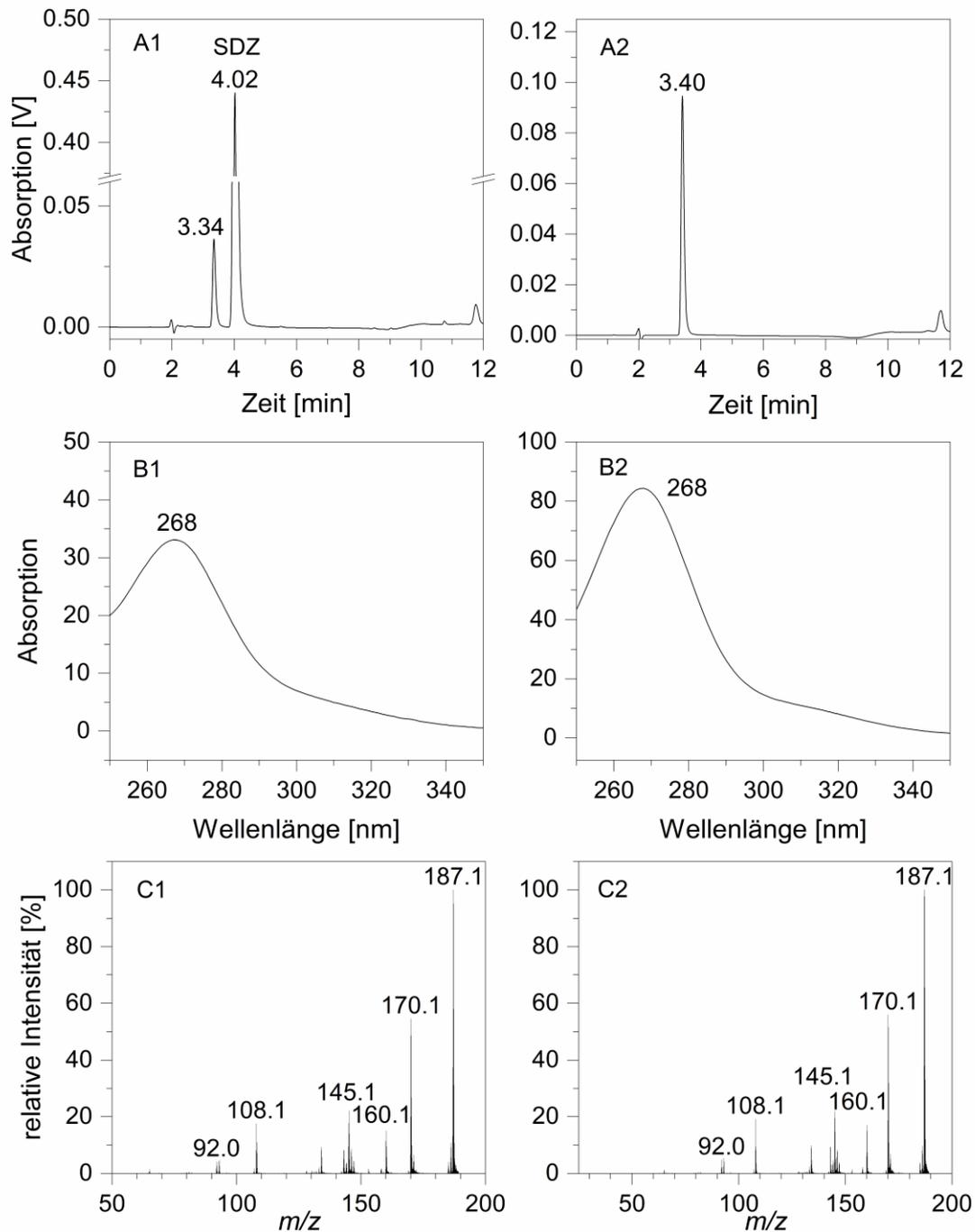


Abbildung 4.42: Vergleiche des Transformationsprodukts von SDZ (**1**) mit 1-*N*-(pyrimidin-2-yl)benzen-1,4-diamin (kommerzieller Standard, **2**) mit den **A**) Retentionszeiten im HPLC-UV-Chromatogramm, **B**) dem Absorptionsmaximum im UV-Spektrum sowie **C**) den Fragmentierungsmustern der m/z -Verhältnisse von 187,1 (CE 30 V) mittels LC-MS.

Die SO_2 -Extrusion ist für Sulfonamide bekannt bei der Pyrolyse (Cook & Hildebrand, 1974; Givens *et al.*, 1984; Stober & DeWitte, 1982) sowie bei Photodegradation (Boreen *et al.*, 2005; Periša *et al.*, 2013; Tentscher *et al.*, 2013). Bei mit künstlichem Sonnenlicht durchgeführten Photolyseexperimenten wurde SDZ innerhalb von 24 Stunden fast vollständig abgebaut (Periša *et al.*, 2013). Gleichzeitig stieg der Gehalt an TP mit dem m/z -Verhältnis von 187, was für den SO_2 -extrudierten SDZ entspricht, und erreichte einen Anteil von 80 % (Flächenanteil zu SDZ-Fläche zu

Beginn des Versuchs). Die Präsenz der SO₂-extrudierten Sulfonamide in der Umwelt wurde bisher nicht untersucht, ist aber wahrscheinlich (J. Li *et al.*, 2021). Yang *et al.* detektierten bei der Oxidation von SDZ mit Permanganat auch SDZ_{ex} (J. F. Yang *et al.*, 2018). Sie führten Tests zur Ökotoxikologie mit dem Programm ECOSAR durch und stellten fest, dass SDZ_{ex} bei der Berechnung der akuten und chronischen Toxizität (Tests mit Fischen, Daphnien und Algen) toxischer ist als die Muttersubstanz SDZ. Auch aus diesem Grund sollten Transformationsprodukte identifiziert und auf ihre Eigenschaften hin untersucht werden, um das Verhalten in der Umwelt und auf den Menschen zumindest abschätzen zu können.

4.6.3 Stabilitätsuntersuchungen zu SDZ_{ex}

In der Literatur fanden sich keine Hinweise zur chemischen Charakterisierung von SDZ_{ex}, sodass als erstes Stabilitätsuntersuchungen durchgeführt wurden. Dafür wurden Stammlösungen aus dem kommerziell erhältlichen Standard für verschiedene Bedingungen (unterschiedliche pH-Werte, Temperaturen sowie Lichteinfluss) angesetzt und mittels einer neu entwickelten HPLC-UV-Methode über einen Untersuchungszeitraum von 3 Wochen analysiert (s. Kapitel 5.6.2 und 5.6.3). Die Lösungen wurden ohne Lichteinfluss gelagert. Für die Lagerung bei Raumtemperatur fand zusätzlich eine Untersuchung des Lichteinflusses statt.

Tabelle 4.30: Prozentualer Gehalt von SDZ_{ex} in verschiedenen Lösungen bei unterschiedlichen pH-Werten oder in Methanol nach 3 Wochen, Startkonzentration $c = 100 \mu\text{g/mL}$.

Temperatur	SDZ _{ex} -Gehalt [%], bezogen auf Tag 0			
	pH 4	pH 7	pH 10	Methanol*
- 18 °C	-	-	-	100,1
4 °C	98,7	98,8	99,6	100,0
Raumtemperatur mit Lichteinfluss	99,6	99,6	99,0	99,6
Raumtemperatur ohne Lichteinfluss	99,2	99,6	99,4	100,2
37 °C	98,9	99,5	99,5	-

* prozentualer Gehalt in der Methanollösung wegen messtechnischer Probleme bezogen auf Tag 1.

Unter den getesteten Bedingungen zeigte SDZ_{ex} über drei Wochen eine hohe Stabilität. Innerhalb des Versuchszeitraums war SDZ_{ex} in allen Lösungen zu mindestens 98,7 % enthalten (Tabelle 4.30). Die hohe Stabilität unter den gewählten Bedingungen impliziert ebenfalls eine

hohe Beständigkeit unter realen Umweltbedingungen und somit eine mögliche Persistenz in der aquatischen Umwelt (OECD, 2004). In den Untersuchungen von SDZ in Kapitel 4.1.2 zeigte sich ebenfalls eine hohe Stabilität für SDZ. Somit unterscheiden sich die Muttersubstanz SDZ und das SO₂-extrudierte Transformationsprodukt SDZ_{ex} in seiner Stabilität unter verschiedenen Bedingungen allenfalls nur geringfügig.

4.6.4 Nachweis antibiotischer Aktivität

Um die Auswirkungen auf die Umwelt sowie einem möglichen Resistenzgeschehen einordnen zu können, ist die mikrobielle Aktivität von SDZ_{ex} bedeutend. Zessel *et al.* (2014) konnten für Photoabbauprodukte von Sulfonamiden keine antibiotische Aktivität mehr nachweisen. Dabei wurden die Photoabbauprodukte als Gemisch mit der Muttersubstanz durch Extrapolation und nicht einzeln untersucht, sodass ein direkter Nachweis für einzelne Photoabbauprodukte nicht geklärt wurde.

Die mikrobielle Aktivität wurde mit dem Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT)-MRL-Suchtest von der Firma Analytik in Milch (AiM) untersucht, der für die Einhaltung der festgelegten Höchstmengen (maximum residue limit, MRL) an Antibiotika in Milch eingesetzt wird (Analytik in Milch, 2019; VO (EU) Nr. 37/2010). In verschiedenen Studien wird der Test auch zum Nachweis von antibiotischer Aktivität von Transformationsprodukten von Antibiotika verwendet (Keßler *et al.*, 2019; Mohring *et al.*, 2009; Rusch *et al.*, 2015). Der eingesetzte Azofarbstoff Brillantschwarz wird durch den verwendeten Testkeim (*Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C953) zu gelben und farblosen Verbindungen reduziert. Wenn ein Hemmstoff in der Probe enthalten ist, hemmt dieser das Wachstum des Testkeims und der Farbstoff wird nicht reduziert. Die Aktivität wird photometrisch im Vergleich zu einer Referenzkonzentration der Positivkontrolle (Penicillin) bestimmt. Nach der Inkubation sind die Kavitäten gelb oder bläulich gefärbt. Dabei bedeutet eine Gelbfärbung, dass keine antimikrobielle Aktivität vorliegt, und die Blaufärbung deutet auf eine Hemmung hin. Als Vergleich wurde die Muttersubstanz SDZ mitgeführt (Abbildung 4.43).

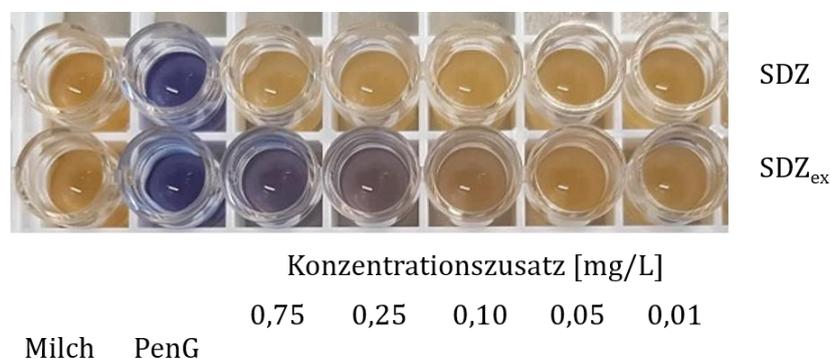


Abbildung 4.43: Brillant-Reduktionstest von SDZ und SDZ_{ex} in verschiedenen Konzentrationszusätzen sowie Negativkontrolle (unbelastete Milch), Positivkontrolle (Penicillin G, PenG, 4 µg/mL).

Im Fall von SDZ wurde erwartungsgemäß mit zunehmender Konzentration eine Zunahme der Hemmwirkung nachgewiesen. Eine Hemmung von 60 % trat bei einer Konzentration von 0,25 mg/L auf (Abbildung 4.43, Abbildung 4.44). Für SDZ_{ex} wurde im zunächst untersuchten Konzentrationsbereich von 0,01 bis 0,75 mg/L keine Hemmung (< 20 %) festgestellt. Deswegen wurden für SDZ_{ex} zusätzlich höhere Konzentrationsstufen bis 200 mg/L getestet. Auch hier lag die Hemmwirkung < 20 % und zeigte keine Zunahme bei höheren Konzentrationen (Abbildung 4.44). Nach Lebensmittelrecht (§ 64 Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch, Methode L 01.00-11) wird eine Probe auch als positiv oder verdächtig bezeichnet, wenn sich der Farbton eindeutig vom Farbton der Negativkontrolle unterscheidet (Analytik in Milch, 2020a). SDZ erzeugt einen deutlichen farblichen Unterschied zur hemmstofffreien Milch und kann auch bei der visuellen Beurteilung als antibiotisch aktiv nachgewiesen werden. SDZ_{ex} dagegen ist farblich nicht auffällig, sodass diese bei der visuellen Beurteilung als unauffällige Probe bezeichnet werden würde.

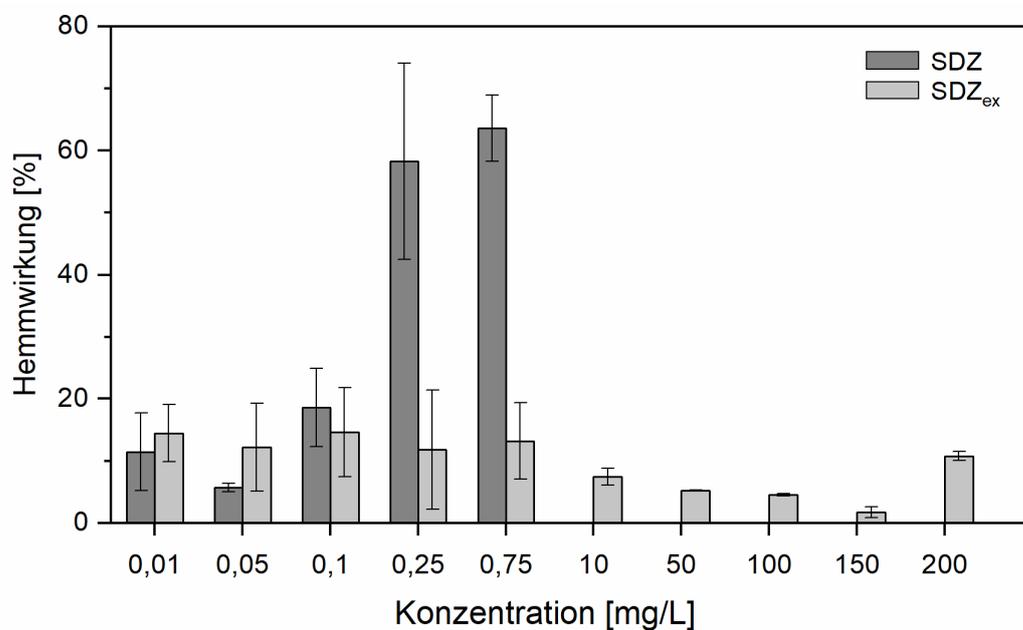


Abbildung 4.44: Hemmstoffwirkung, bestimmt durch BRT-MRL-Suchtest von SDZ und SDZ_{ex} in verschiedenen Konzentrationen.

Für SDZ_{ex} konnte keine antibiotische Aktivität nachgewiesen werden. Die Transformation durch SO₂-Extrusion könnte daher eine antibiotische Deaktivierung von SDZ bedeuten. Somit kann die Aussage von Zessel *et al.* (2014) in Bezug auf die dort untersuchte Mischung der Photoprodukte ergänzt werden. Bezüglich einer Minderung der Resistenzentwicklung und -verbreitung in der Umwelt durch die geringere antibiotische Aktivität von SDZ_{ex} müssten noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

4.6.5 Interaktion zwischen Modellbiofilm und SDZ_{ex}

4.6.5.1 HPLC-UV-Ergebnisse von SDZ_{ex} beim Modellbiofilmexperiment

Das TP SDZ_{ex} wurde ebenfalls gegenüber dem in dieser Arbeit etablierten Modellbiofilm eingesetzt, um ein mögliches Umweltverhalten besser abschätzen zu können. Die Versuche waren so aufgebaut wie bei SDZ und TMP im Kapitel 4.4.3.1. In der folgenden Abbildung sind die relativen SDZ_{ex} -Gehalte im Versuchszeitraum von 7 Tagen dargestellt (Abbildung 4.45).

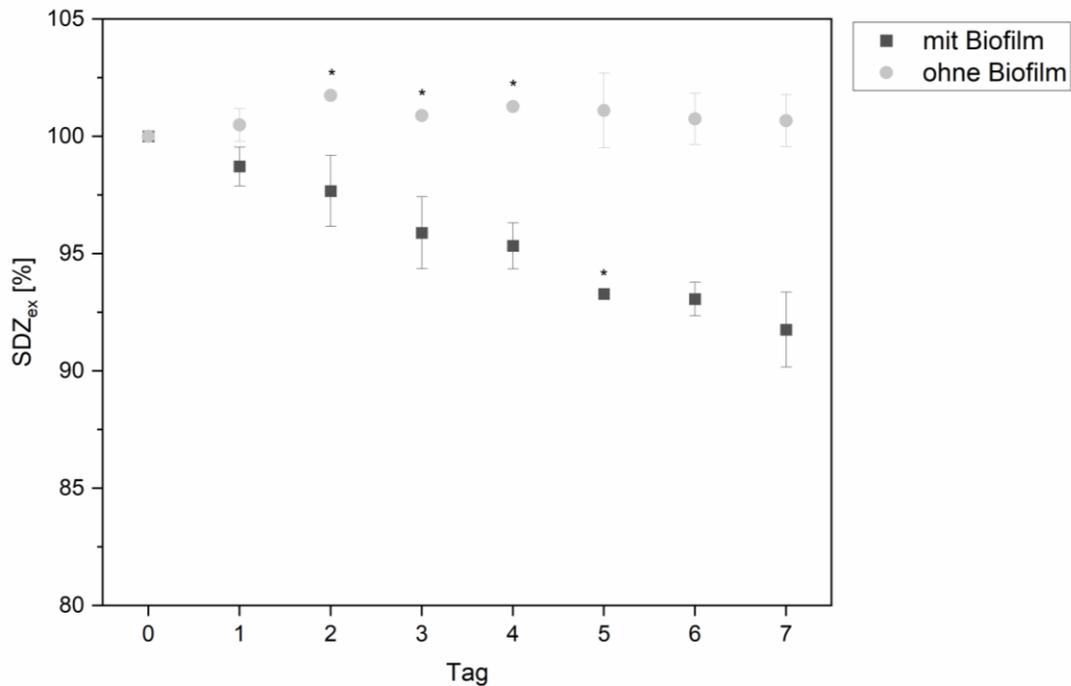


Abbildung 4.45: Prozentuale SDZ_{ex} -Gehalte (bezogen auf Tag 0) in den Röhren mit und ohne Biofilm im Versuchszeitraum von 7 Tagen; die Kennzeichnung * bedeutet, dass die Probenahme an diesem Tag nur in einem Versuch durchgeführt wurde.

Die HPLC-UV-Ergebnisse zeigen, dass sich der Gehalt von SDZ_{ex} kontinuierlich im Versuchszeitraum auf einen relativen Gehalt von $91,8 \pm 1,6$ % verringerte. Im Vergleich dazu blieb der Gehalt von SDZ_{ex} in der abiotischen Kontrolle ohne Biofilm konstant. Im UV-Chromatogramm konnte im Rohr mit Biofilm ein neuer Peak detektiert werden, der in der eingesetzten RP-Chromatographie hinter SDZ_{ex} bei 6,8 min eluiert und somit unpolarer einzustufen ist (Abbildung 4.46 A).

Die Abnahme des Gehalts von SDZ_{ex} um 8,2 % auf $91,8 \mu\text{g/mL}$ wurde von einer kontinuierlichen Zunahme des TP-Peaks begleitet (Abbildung 4.46 B). Die Peakfläche des Peaks entsprach, bezogen auf den SDZ_{ex} -Standard, $7,8 \mu\text{g/mL}$. Das bedeutet, dass der Verlust an SDZ_{ex} im Versuchszeitraum höchstwahrscheinlich vollständig auf die Bildung des neuen Produkts zurückgeht (gleiche molare Extinktionskoeffizienten vorausgesetzt).

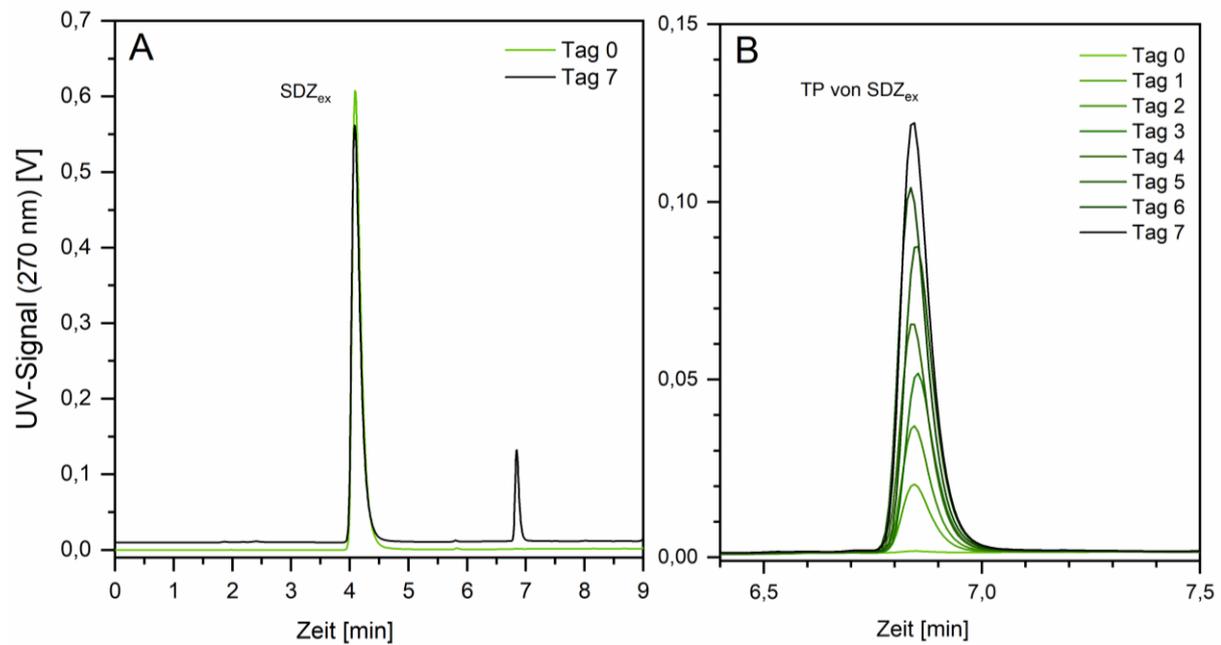


Abbildung 4.46: HPLC-UV-Chromatogramme des Biofilmexperiments mit SDZ_{ex} mit (A) dotierte Biofilmrohrprobe an Tag 0 und 7 und (B) zeitlicher Verlauf der Peakintensität des Transformationsprodukts von SDZ_{ex} von Tag 0 bis Tag 7.

4.6.5.2 Identifizierung des Transformationsproduktes von SDZ_{ex}

Das durch den Modellbiofilm gebildete Transformationsprodukt von SDZ_{ex} sollte identifiziert werden. Durch einen Biofilmversuch mit Monokulturen (*E. coli* oder *P. fluorescens*) konnte nachgewiesen werden, dass *P. fluorescens* die Transformationsreaktion durchführt. Die gezielte TP-Bildung wurde deswegen in einer Bakterienkultur von *P. fluorescens* in einem PVC-Rohr durch Zusatz von SDZ_{ex} durchgeführt (Details Kapitel 5.6.5). Nach 8 Wochen in Lösung wurde SDZ_{ex} vollständig in das TP umgewandelt. Für das TP wurde anschließend die HR-MS-Messung mittels Direktinjektion am QTOF durchgeführt.

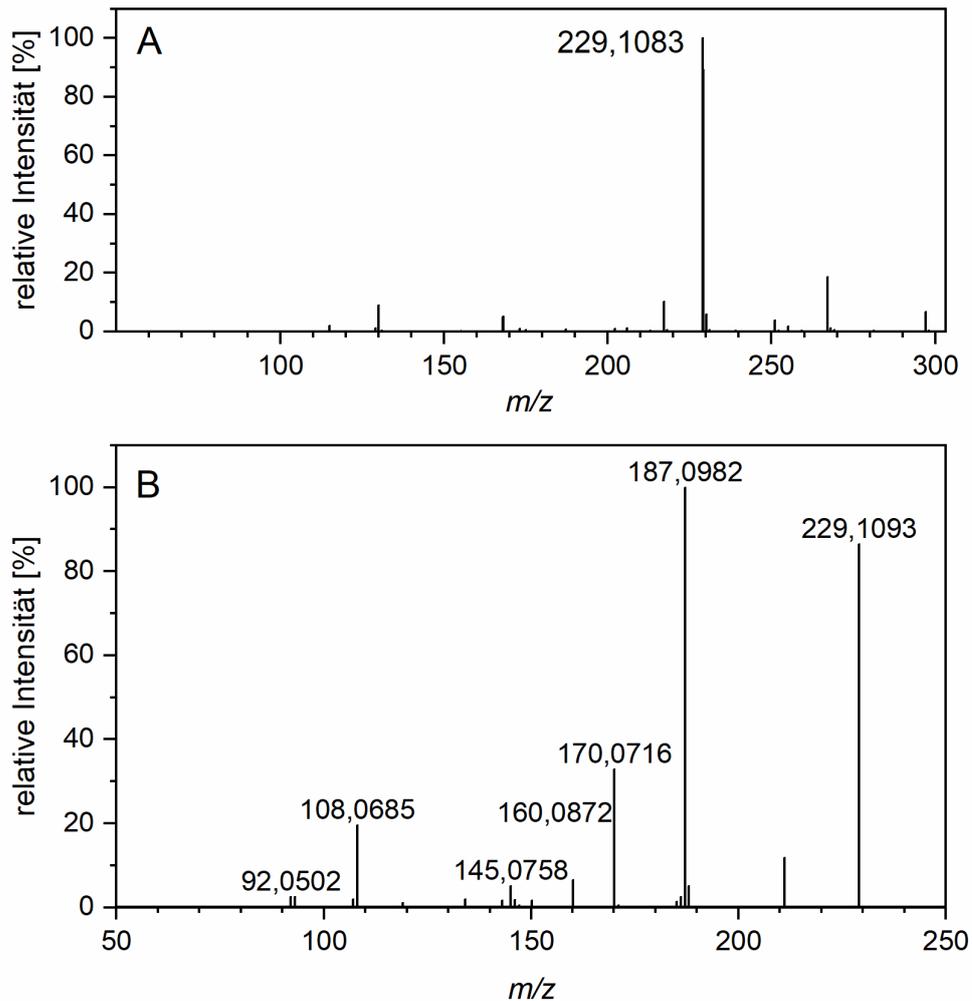


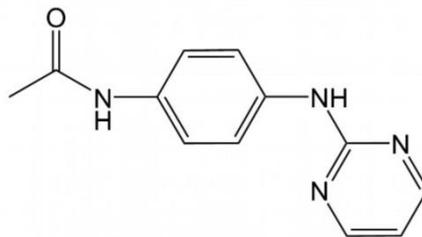
Abbildung 4.47: HR-MS-Messung mittels ESI⁺-TOF-MS der isolierten Fraktion des potenziellen Transformationsprodukts von SDZ_{ex} mit **A**) Full Scan und **B**) Fragmentierungsspektrum des m/z -Verhältnisses von 229,1 (CE 30 V).

Im Spektrum der Full-Scan-Messung trat ein deutliches Signal bei dem m/z -Verhältnis von 229,1083 auf (Abbildung 4.47 A). Dieses wurde für die nachfolgenden MS/MS-Untersuchungen ausgewählt. Das Fragmentierungsmuster entsprach nach Abspaltung einer Gruppe dem von SDZ_{ex} (Abbildung 4.47 B, Vergleich Abbildung 4.39). Somit kann es sich bei der Transformation um eine Gruppe handeln, die die grundlegende Struktur des Moleküls nicht verändert. Deshalb kann unter anderem eine Ringspaltung ausgeschlossen werden.

Tabelle 4.31: Vorschlag der Summenformel für das TP von SDZ_{ex} sowie der Fragmente mit theoretisch und experimentell ermitteltem m/z -Verhältnis sowie die berechneten Abweichungen.

Summenformel	[M+H] ⁺ (m/z -Verhältnis)		Abweichung [ppm]
	theoretisch	experimentell	
C ₁₂ H ₁₂ N ₄ O	229,10839	229,10829	-0,4
C ₁₀ H ₁₁ N ₄ (SDZ _{ex})	187,09782	187,09779	-0,2
<i>Fragmente</i>			
C ₆ H ₆ N	92,0495	92,0502	7,9
C ₆ H ₈ N ₂	108,0682	108,0685	2,9
C ₉ H ₉ N ₂	145,0760	145,0758	-1,4
C ₉ H ₁₀ N ₃	160,0869	160,0872	1,7
C ₁₀ H ₈ N ₃	170,0713	170,0716	1,9
C ₁₀ H ₁₁ N ₄	187,0978	187,0982	2,0

Die Acetylierung ist eine oft beschriebene Transformation und Metabolisierung von Sulfonamiden (Periša *et al.*, 2013; Sukul *et al.*, 2008a; Zinner & Mayer, 2015). Der Vorschlag des ermittelten m/z -Verhältnisses entspricht dieser Art von Transformation (Addition von C₂H₂O, Tabelle 4.31), sodass davon ausgegangen wird, dass es sich dabei um das endständige acetylierte SDZ_{ex} handelt (Abbildung 4.48). Das Fragmentierungsmuster stimmt mit den m/z -Verhältnissen der Fragmente von 187, 170, 108 und 92 mit dem in der Literatur beschriebenen überein (Periša *et al.*, 2013).

Abbildung 4.48: Acetyliertes SDZ_{ex} nach beschriebener Acetylierung von Sulfonamiden (Sittig *et al.*, 2014).

Eine von *P. fluorescens* vorgenommene *N*-Acetylierung von Arylaminen konnte bereits nachgewiesen werden (Okumura *et al.*, 1995). Die verwendete Pseudomonaden-Art wird oft im Boden nachgewiesen. Nach Photodegradation von SDZ auf Gülle und Ausbringung der SDZ_{ex}-haltigen Gülle könnte SDZ_{ex} durch Pseudomonaden im Boden acetyliert vorliegen (Baran *et al.*, 2011; Demanèche *et al.*, 2001). Eine andere Möglichkeit wäre das Ausbringen von SDZ-haltiger Gülle, die in den Boden untergepflügt wird. Im Boden könnte SDZ ebenfalls eine SO₂-Extrusion durch Pilze widerfahren (García-Galán *et al.*, 2011; Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2012) und durch Pseudomonaden acetyliert werden.

Periša *et al.* (2013) schlugen einen anderen Reaktionsweg vor. Zunächst wird SDZ selbst acetyliert und dann durch Photodegradation SO₂-extrudiert, wodurch das acetylierte SDZ_{ex} entsteht. Somit wäre es möglich, dass dieses Produkt auf verschiedenen Wegen in die Umwelt gelangen könnte.

Interessant dabei ist, dass SDZ_{ex} aber nicht SDZ im Versuchszeitraum von 7 Tagen durch den Biofilm transformiert wurde. Bei strukturähnlichen Substanzen konnte dies ebenfalls beobachtet werden. Sulfanilamid mit einer SO₂-Gruppe wurde nicht, aber zum Beispiel 4-Aminobiphenyl (ohne SO₂-Gruppe) wurde durch *P. fluorescens* acetyliert (Abbildung 4.49) (Okumura *et al.*, 1995). Die *N*-Acetylierung durch *P. fluorescens* scheint von der Anwesenheit der SO₂-Gruppe abhängig zu sein.

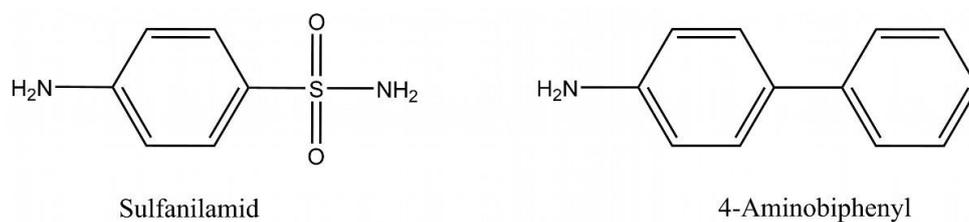


Abbildung 4.49: Struktur von Sulfanilamid und 4-Aminobiphenyl.

4.6.6 Zusammenfassung und Ausblick

Es konnte gezeigt werden, dass SDZ beim Autoklavieren unter SO₂-Verlust zu SDZ_{ex} umgewandelt werden kann. Diese Reaktion ist bisher für Sulfonamide bei Pyrolyse und Photodegradationsreaktionen bekannt. SDZ_{ex} selbst ist bisher aber kaum beschrieben, weshalb Untersuchungen zur Stabilität durchgeführt wurden. SDZ_{ex} zeigte eine hohe Stabilität in Methanol sowie bei den pH-Werten 4, 7 und 10 sowie unterschiedlichen Temperaturen über einen Versuchszeitraum von 3 Wochen. Zusätzlich konnte mittels BRT-MRL-Suchtests keine antimikrobielle Aktivität gegenüber dem empfindlichen Testkeim bis 200 mg/L nachgewiesen werden. Bei der Konfrontation mit dem Modellbiofilm mit *P. fluorescens* konnte gezeigt werden, dass der Biofilm SDZ_{ex} acetyliert, das in der Natur nachgewiesen werden konnte. Dabei gehen die Autoren von einer Photodegradation von bereits acetyliertem SDZ aus (Periša *et al.*, 2013). Nun konnte in dieser Arbeit ein anderer möglicher Reaktionsweg beschrieben werden.

Eine Untersuchung der SO₂-Extrusion sowie eine darauffolgende Konfrontation mit dem Modellbiofilm könnte für weitere Sulfonamide durchgeführt werden. Dazu könnten Transformationsprodukte identifiziert und auf ihre antibiotische Aktivität bestimmt werden. Somit könnte man die bisherigen Erkenntnisse über Sulfonamide und ihre Aktivitäten und Bedeutung in der Umwelt ergänzen.

4.7 Interaktion von Sulfadiazin mit reduzierenden Zuckern

4.7.1 Hintergrund

In Arzneimittelformulierungen sind nicht nur Wirkstoffe enthalten, sondern auch Formulierungshilfsstoffe, wie zum Beispiel Füllstoffe oder Konservierungsstoffe (Fathima *et al.*, 2011; Reker *et al.*, 2019). Der DBU-Projektpartner vom Institut für Partikeltechnik der TU Braunschweig hat für die Arzneimittelherstellung im Projektverbund den Füllstoff Lactose (Lac) verwendet. Lactose ist ein reduzierender Zucker. Deshalb sollte auf mögliche Interaktionen zwischen Lactose und den verwendeten Wirkstoffen SDZ und TMP geprüft werden. In Veterinärapplikationen wird oft der Hilfsstoff Glucose (Glc) verwendet, weshalb auch hier auf mögliche Nebenreaktionen geprüft wurde.

Die beiden Hilfsstoffe sind für die Arzneimittelherstellung zugelassen (EDQM, 2023). Bei der Zulassung eines Arzneimittels sind nach § 10 Absatz 2 TAMG Fachinformationen bezüglich der Ergebnisse zu analytischer und pharmakologisch-toxikologischen Prüfungen vorzulegen (TAMG, 2021). Daraus muss hervorgehen, ob das Arzneimittel die nach den anerkannten pharmazeutischen Regeln angemessene Qualität aufweist. Dabei sollte auf die Kompatibilität der Formulierungshilfsstoffe mit den aktiven pharmazeutischen Inhaltsstoffen geachtet werden. Im Handbuch für pharmazeutische Hilfsstoffe wird darauf hingewiesen, dass Lactose eine Kondensationsreaktion nach Art der Maillard-Reaktion mit primären Aminen durchführen kann (Rowe *et al.*, 2006). Somit bedarf es bei Lactose erhöhter Aufmerksamkeit, um Nebenprodukte auszuschließen, die die Bioverfügbarkeit des Wirkstoffs verringern. Das *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) ist für die Harmonisierung der Beurteilungskriterien von Humanarzneimitteln zuständig. Obwohl die ICH-Richtlinie für Stabilitätsuntersuchungen für neue Arzneimittel nicht ausdrücklich für Formulierungshilfsstoffe konzipiert wurde, können diese Untersuchungen auch dafür verwendet werden (ICH, 2003; IPEC, 2010, 2020). Gemäß der Richtlinie wird dann auf Reinheit und Stabilität bezüglich der finalen Formulierung getestet. Von vielen Autoren wird vorgeschlagen, Instabilitäten schon in der Vorformulierung zu testen (Abrantes *et al.*, 2016; Chadha & Bhandari, 2014; Freitas *et al.*, 2007; Honmane *et al.*, 2017). Ein einfacher Versuchsansatz ist die Herstellung einer binären Lösung aus Hilfsstoff und Wirkstoff, die dann z.B. mittels HPLC-Analyse überprüft wird (Abrantes *et al.*, 2016).

4.7.2 Versuchsaufbau und Ergebnisse

Der Nachweis für eine mögliche Interaktion zwischen Wirkstoff (SDZ 750 mg/L, TMP 150 mg/L) und Hilfsstoff (Lactose 5.918 mg/L, Glucose 3.114 mg/L) wurde bei verschiedenen pH-Werten bei 37 °C unter Lichtausschluss, über einen Zeitraum von 4 Monaten untersucht (Tabelle 4.32). Als Kontrollen fungierten eine Lösung mit dem Zusatz Sorbitol (3.149 mg/L) als nicht reduzierender Zucker und eine Lösung ohne Zusatz.

Tabelle 4.32: Zusammensetzung der Proben des Interaktionsversuchs von SDZ und/oder TMP mit reduzierenden Zuckern und die entsprechenden Kontrollen.

Probennummer	pH-Wert	SDZ	TMP	Lactose	Glucose	Sorbitol	Ohne Zusatz
1-3	2, 7, 10	x		x			
4-6	2, 7, 10	x			x		
7-9	2, 7, 10	x				x	
10-12	2, 7, 10	x					x
13-15	2, 7, 10	x	x	x			
16-18	2, 7, 10	x	x		x		
19-21	2, 7, 10	x	x			x	
22-24	2, 7, 10	x	x				x
25-27	2, 7, 10		x	x			
28-30	2, 7, 10		x		x		
31-33	2, 7, 10		x			x	
34-36	2, 7, 10		x				x
Blindwerte	2, 7, 10			x			
	2, 7, 10				x		
	2, 7, 10					x	
	2, 7, 10						x

In den Lösungen, die sowohl SDZ als auch einen reduzierenden Zucker enthielten, wurde ein zusätzlicher Peak detektiert. Bei dem Zusatz von Lac erfolgte die Elution bei 2,95 min und bei Glc bei 3,3 min (Abbildung 4.50). In den Lösungen mit TMP und reduzierendem Zucker sowie in den Kontrolllösungen (Lösung mit nur Wirkstoff oder nur mit reduzierendem Zucker) war der Peak nicht enthalten.

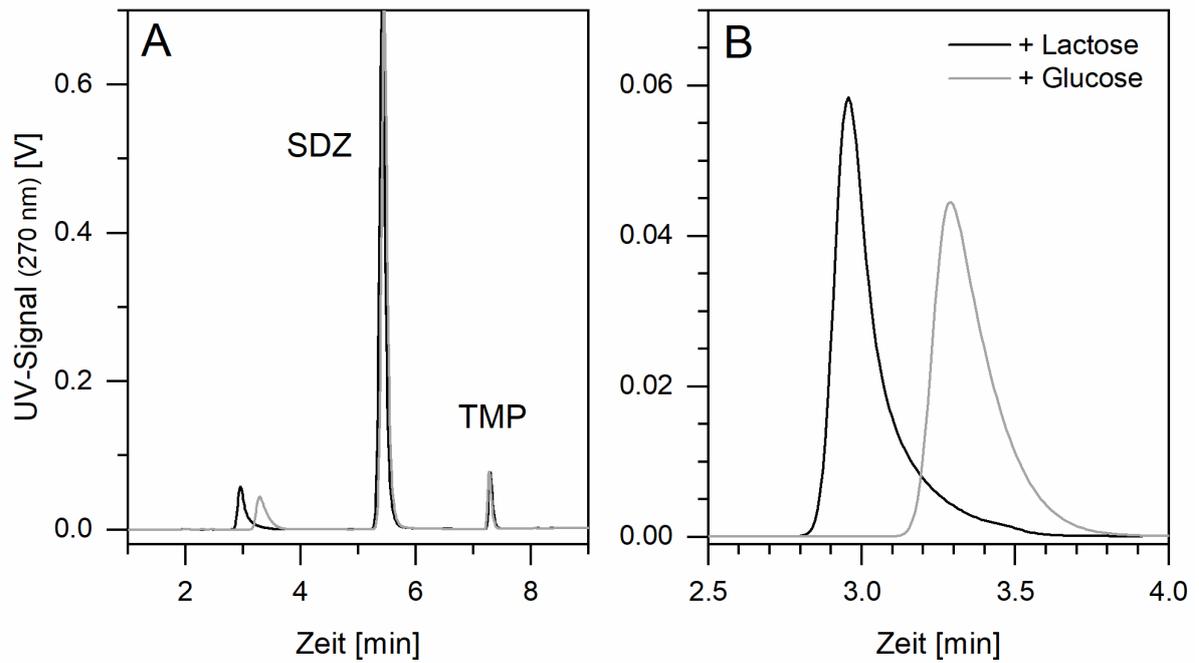


Abbildung 4.50: UV-Chromatogramme: **A)** SDZ und TMP mit Lactose oder Glucose bei einem pH-Wert von 10 nach 3 Monaten; **B)** Chromatogrammausschnitt von A.

Die neu gebildeten Peaks wurden bei beiden genannten Wirkstoffvarianten und bei allen untersuchten pH-Werten beobachtet (Abbildung 4.51). Die Ergebnisse waren dabei unabhängig vom zugesetzten reduzierenden Zucker sowie unabhängig von dem Zusatz von TMP (Tabelle 4.32 und Tabelle 4.33).

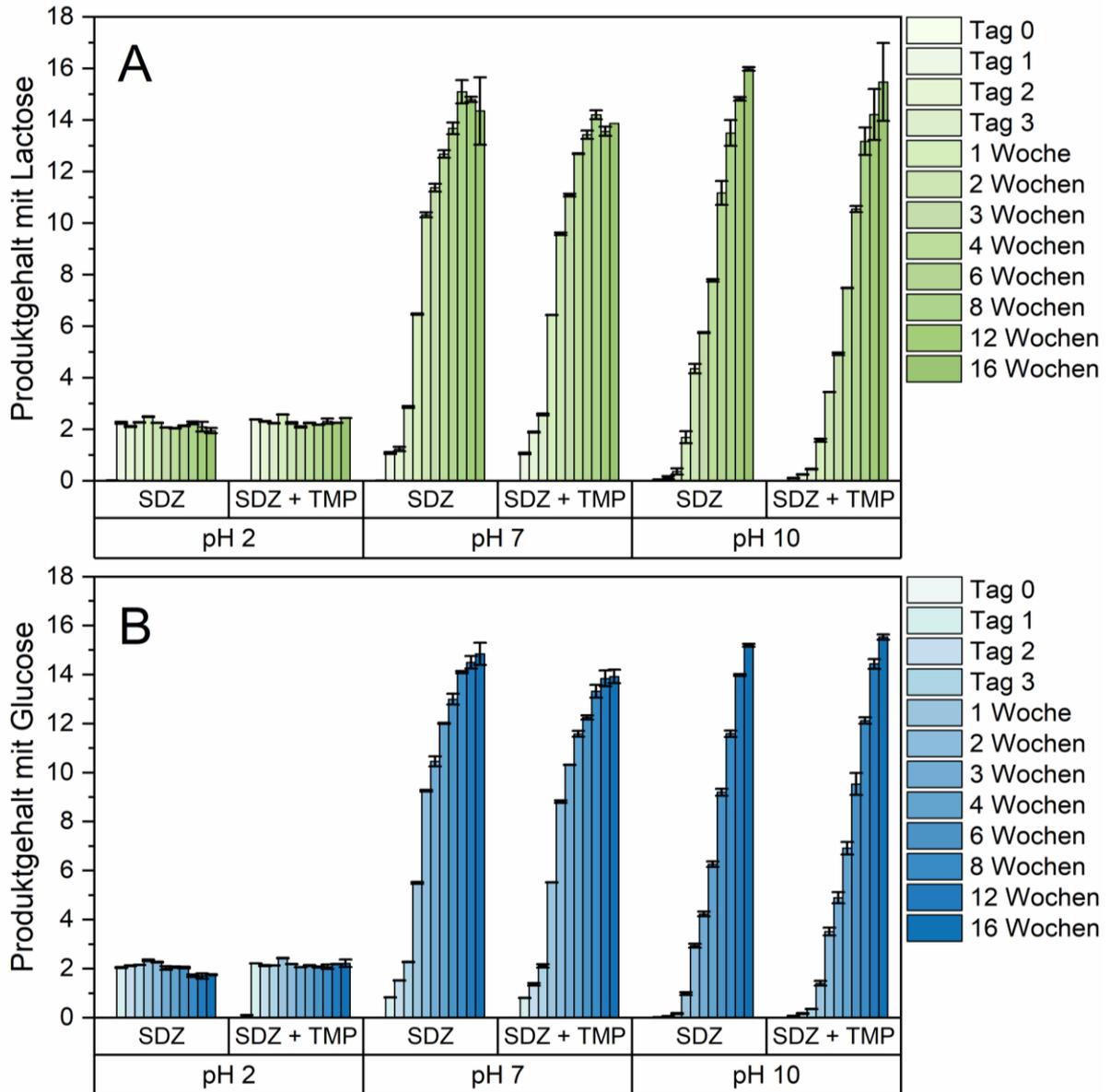


Abbildung 4.51: Anteil der neu gebildeten Peaks in Lösungen von SDZ bzw. SDZ+TMP mit **A)** Lactose-Zusatz und **B)** Glucose-Zusatz bei verschiedenen pH-Werten über einen Zeitraum von 16 Wochen; der Anteil der Peakflächen wurde in Relation zu einem SDZ-Standard (100 mg/L) berechnet.

Die Bildung der neu gebildeten Peaks verlief bei beiden reduzierenden Zuckern gleich und war quantitativ abhängig vom pH-Wert der Lösung. Bei pH 2 wurde der Peak innerhalb eines Tages gebildet und blieb dann über den Versuchszeitraum konstant bei 2 % (Abbildung 4.51). Bei neutralem pH-Wert und im alkalischen Milieu bildete sich der Peak langsamer, die Peakintensität stieg dafür im Laufe des Untersuchungszeitraums an. Im neutralen Bereich wurde nach ca. 6 Wochen ein Plateau bei 14 % erreicht (Abbildung 4.51). Diese Plateaubildung deutet auf eine Gleichgewichtsreaktion hin. Somit ist die anfänglich beschriebene Säurelabilität eine Verschiebung des Gleichgewichts auf die Seite der Einzelstoffe durch die pH-Erniedrigung. Unter alkalischen Bedingungen wurde diese Plateaubildung nicht verzeichnet. Der Anteil des neu gebildeten

Peaks lag am Ende bei 16 % (Abbildung 4.51). Die Aufschlüsselung der Ergebnisse für alle Versuchstage befindet sich im Anhang in Kapitel 7.4 in Tabelle 7.8 und Tabelle 7.9.

Tabelle 4.33: Relativer Produkt-Gehalt bezogen auf den SDZ-Tagesstandard (100 mg/L) in der Einzelwirkstoff- und der Kombinationswirkstofflösung bei pH-Werten von 2, 7 und 10 am Versuchstag 112 (4 Monate) mit Lac oder Glc.

Reduzierender Zucker	Produkt-Gehalt [SDZ-Flächen-%]					
	pH 2		pH 7		pH 10	
	SDZ	SDZ+TMP	SDZ	SDZ+TMP	SDZ	SDZ+TMP
mit Lactose	2,0 ± 0,1	2,4 ± 0,0	14,4 ± 1,3	13,9 ± 0,0	16,0 ± 0,1	15,5 ± 1,5
mit Glucose	1,8 ± 0,0	2,2 ± 0,2	14,9 ± 0,5	13,9 ± 0,3	15,2 ± 0,1	15,5 ± 0,1

4.7.3 Identifizierung des Produktes mit Lactose

Für die Identifizierung der mit Lac gebildeten unbekanntes Substanz wurde die Fraktion mittels semipräparativer HPLC isoliert, eingeengt und in Methanol/Wasser für die HR-MS-Messung aufgenommen. Das Produkt war im Sauren durch die Verschiebung des Gleichgewichts auf Seiten der Edukte nur in geringem Maße enthalten. In der Full Scan Messung der isolierten Lösung wies SDZ (m/z -Verhältnis von 251) die höchste Intensität auf (Abbildung 4.52). Die Zeit des Fraktions-sammelns und die damit verbundene Lagerung in der sauren Eluentenlösung schien auszu-reichen, um einen Teil des Produkts wieder zurückzubilden. Darauf folgen die Signale des m/z -Verhältnisses des Natrium-Addukts von Lactose (m/z -Verhältnis von 365) und das m/z -Verhält-nis von 575 der unbekanntes Substanz.

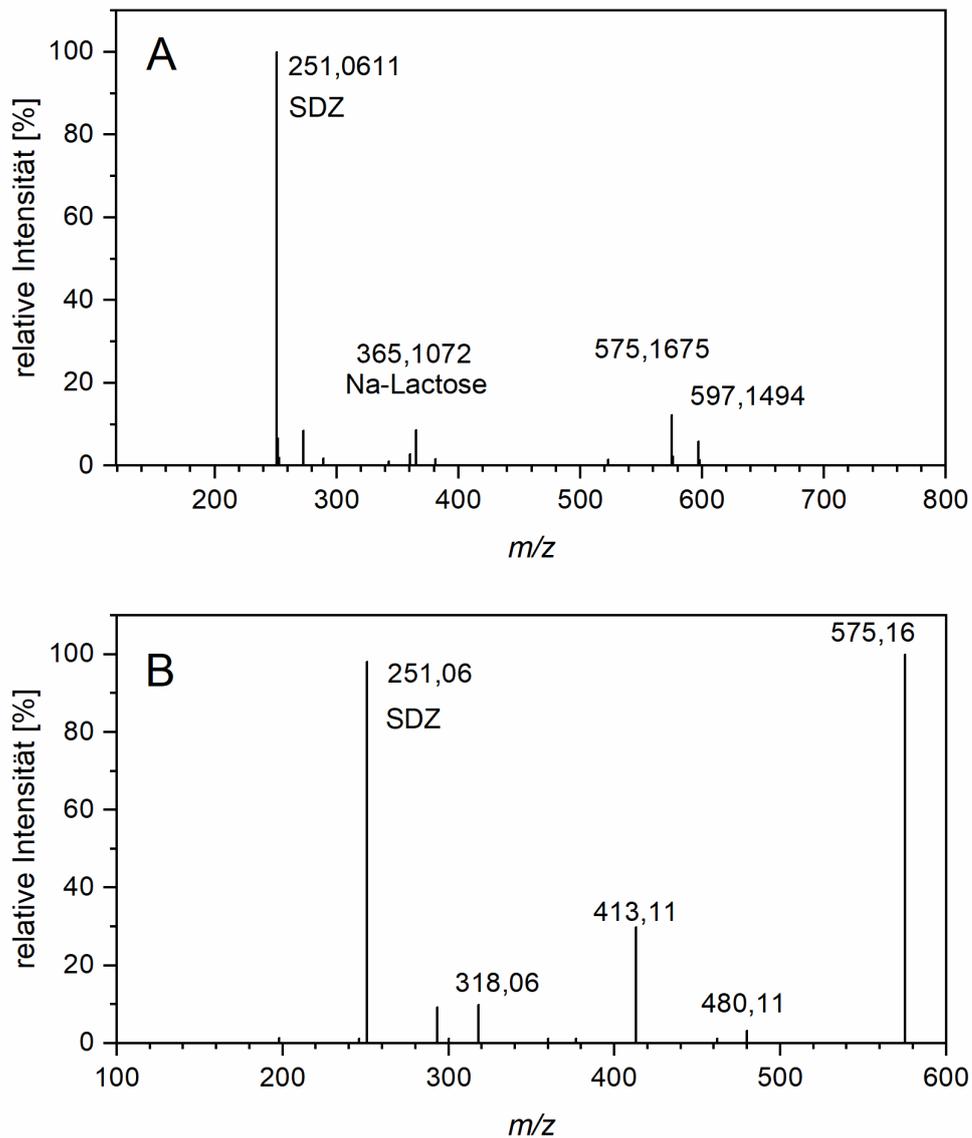


Abbildung 4.52: HR-MS-Messung mittels ESI+-TOF-MS der isolierten Fraktion des potenziellen Produkts von SDZ und Lactose mit **A**) Full Scan Modus und **B**) Fragmentierungsspektrum des m/z -Verhältnisses von 575,1 (CE 20 V).

Durch das Wissen, dass sich das TP zu SDZ zurückbilden kann und dass sich dadurch in der Summenformel mindestens SDZ enthalten sein muss, kam als Summenformel ein Addukt aus Lactose und SDZ in Frage (Tabelle 4.34).

Tabelle 4.34: Vorschläge für Summenformeln des Interaktionsversuchs von SDZ und Lactose der m/z -Verhältnisse im Full Scan Modus mit den theoretisch und experimentell ermittelten m/z -Verhältnissen sowie die errechneten Abweichungen.

Summenformel	m/z -Verhältnis		Abweichung [ppm]
	theoretisch	experimentell	
<i>Full Scan</i>			
$C_{22}H_{30}N_4O_{12}S$	575,1675	575,1654	3,8
$C_{10}H_{10}N_4O_2S$ (SDZ)	251,0597	251,0611	5,4
$C_{12}H_{22}O_{11}Na$ (Na-Lac)	365,1054	365,1072	4,8

Im Fragmentierungsmuster ließ sich das m/z -Verhältnis von 413,11 dem Glucosyl-Produkt (Abspaltung der Galactose) zuordnen (Abbildung 4.53). Bei vollständiger Abspaltung der Lactose entstand das Fragment SDZ. Für SDZ selbst ist das Fragment mit dem m/z -Verhältnis von 156 nach Abspaltung der Aminopyrimidingruppe (Neutralverlust von 95) typisch (Lamshöft *et al.*, 2007). Dadurch lassen sich die zwei weiteren Fragmente erklären. Das m/z -Verhältnis von 480,11 gehört zu dem Lactosyl-Produkt mit Abspaltung des Aminopyrimidin von SDZ und das m/z -Verhältnis von 318,06 zu dem Glucosyl-Produkt mit der Abspaltung von Aminopyrimidin. Somit ließ sich aus der Summenformel und dem Fragmentierungsmuster auf N^4 -Lactosyl-Sulfadiazin schließen (Abbildung 4.53).

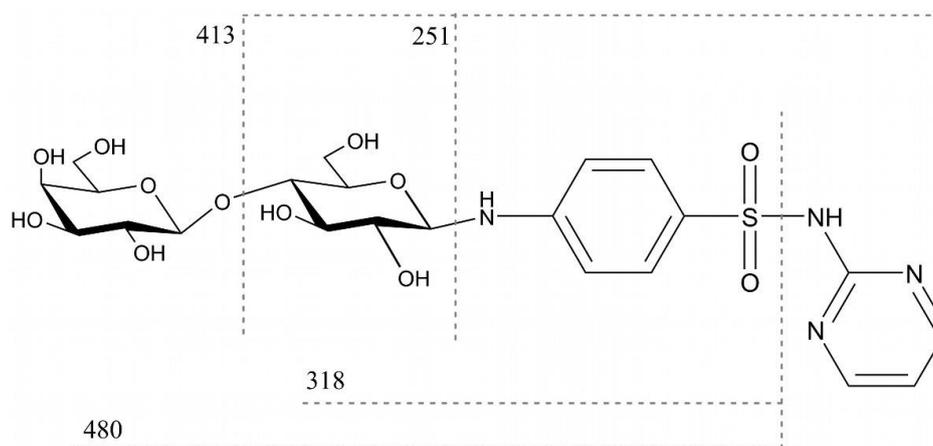


Abbildung 4.53: Strukturvorschlag für Lactosyl-SDZ mit Fragmentierungsbruchstellen und dem zugehörigen m/z -Verhältnis $[M+H]^+$.

Derartige Addukte von Sulfonamiden mit Zuckern wie Lactose sind aus Milch bekannt (Paulson *et al.*, 1992). Das Fragmentierungsmuster stimmte mit dem Lactosyl-Produkt von Sulfamethazin überein, das in Milch nachgewiesen wurde (Turnipseed *et al.*, 2011). Hier konnten ebenfalls das Glucosyl-Produkt sowie Sulfamethazin als Fragmente detektiert werden. Glycosylamine sind säurelabil, was für das hier entstandene Produkt bestätigt werden konnte (Lucida *et al.*, 2000; Sheth *et al.*, 1990). Dass die Bildung der Glycosylamine pH-abhängig ist und nach einer gewissen

Zeit einen Gleichgewichtszustand erreicht, konnten auch Lucida *et al.*, (2000) für Sulfamethoxazol mit Glucose feststellen. Die pH-Abhängigkeit der Produktbildung lässt sich mit dem pKs-Wert der α -Amino-Gruppe erklären. Bei höheren pH-Werten ist die Amino-Gruppe nicht protoniert und kann die Aldehyd-Gruppe angreifen. Unter Abspaltung von Wasser entsteht das Kondensationsprodukt aus einer Amino-Gruppe und einem Aldehyden (Harmon *et al.*, 2000). Bei einem pH-Wert von 2 liegt die Amino-Gruppe überwiegend protoniert vor, sodass die Amino-Gruppe nur zum Teil an die Aldehyd-Gruppe angreifen kann und die Produktbildung hier nur in geringem Umfang stattfindet.

Für den neuen Peak in der Glucose-Lösung konnte aus Zeitgründen keine Identifizierung durchgeführt werden. Es wurde davon ausgegangen, dass ebenfalls eine Kondensation zwischen Glucose und der Amino-Gruppe von SDZ abläuft sowie es auch für Sulfamethazin und Glucose beschrieben wurde (Lucida *et al.*, 2000).

4.7.4 HPLC-UV-Untersuchung der Arzneimittelformulierung der TU Braunschweig

Der Projektpartner vom Institut für Partikeltechnik von der TU Braunschweig stellte im DBU-Projektverbund Nanopartikel aus TMP und Natrium-SDZ mit Lactose durch Hochenergiegranulation her, um die Bioverfügbarkeit der Wirkstoffe in der Formulierung zu erhöhen (Kietzmann *et al.*, 2019). Dafür wurden Feststoffträgerpartikel (Hilfsstoffe wie Lactose) und Natriumsulfadiazin vorgelegt und eine TMP-Nanosuspension als Bindeflüssigkeit eingebracht. Durch einen Rotor wurden die Partikel in einen Wirbelschichtzustand überführt. Die granulierten und feuchte Masse wurde danach bei 50 °C im Trockenschrank über 24 h getrocknet. Die hiesige Aufgabe war es, die Gehalte an TMP und SDZ in diesen Formulierungsprodukten zu bestimmen und die Reinheit im HPLC-UV-Chromatogramm zu prüfen (Abbildung 4.54).

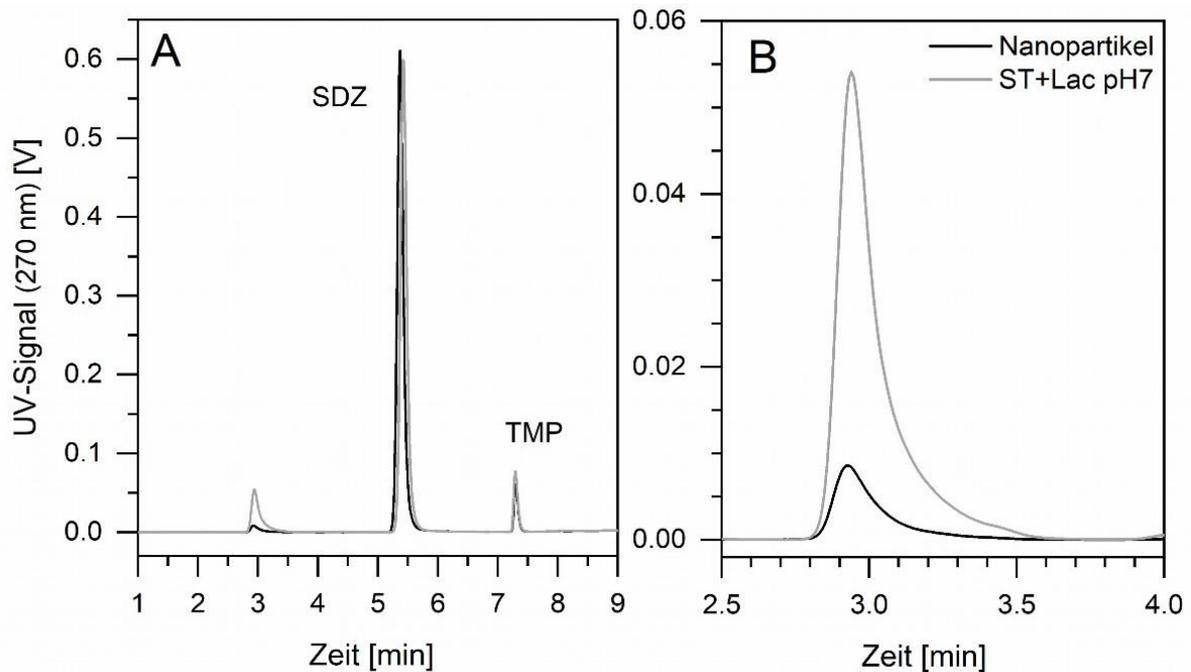


Abbildung 4.54: **A)** HPLC-UV-Chromatogramme einer Lösung der an TU Braunschweig hergestellten Nanopartikel und der Lösung mit SDZ (S), TMP (T) mit Lactose (Lac) bei pH7, die das Lactosylprodukt von SDZ enthält; **B)** Chromatogrammausschnitt von A zur Retentionszeit des Lactosylproduktes.

In der Lösung der Nanopartikel eluierte ein Peak zur gleichen Retentionszeit wie das nachgewiesene Produkt aus den eigenen Interaktionsversuchen mit Lactose. Der relative Gehalt des Produktes betrug bis zu 2 % (bezogen auf den Tagesstandard von SDZ: 110 mg/L) in der 1-mm-Siebfraktion. Somit kann auch bei der Arzneimittelherstellung ohne Lagerung in Lösungen Lactosyl-SDZ gebildet werden. Für die Arzneimittelzulassung wären bei den Untersuchungen zur Formulationsstabilität und Reinheit ein neuer Peak wie das Lactosyl-SDZ-Produkt und der Wirkstoffverlust aufgefallen, sodass in solchen Fällen weitere Versuche beispielsweise zur Prozessoptimierung ohne Wirkstoffverlust durchgeführt würden. Durch die Gleichgewichtsreaktion zwischen Lactose und SDZ und dem Produkt wird durch Erniedrigung des pH-Wertes das Gleichgewicht auf die Seite der Einzelstoffe verschoben. Somit könnte sich SDZ im Magen aus dem Lactosylprodukt fast vollständig zurückbilden und der Gehalt des Wirkstoffs wäre nicht beeinträchtigt.

Im DBU-Projektverbund wurden mehrere Herstellungswege für eine feste Formulierung von TMP und SDZ untersucht und bezüglich ihrer Freisetzung und Bioverfügbarkeit verglichen. Die hier untersuchte Formulierung mit dem enthaltenen Lactosyl-SDZ war uncoated und unterschied sich nicht in der Freisetzung im Vergleich zum Handelsprodukt von aniMedica (Kietzmann *et al.*, 2019). Auch Parkin *et al.* (1997) konnten keine signifikante Veränderung in der Absorptionsrate und der Bioverfügbarkeit bei Verabreichung von Glucose und einem Sulfonamid feststellen. Dies bestätigt die Annahme, dass sich das Produkt im Magen wieder überwiegen zu dem originären

Wirkstoff zurückbildet, sodass der reduzierende Zucker nur einen marginalen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit und Wirkung hat.

4.7.5 Zusammenfassung und Ausblick

Es konnte nachgewiesen werden, dass SDZ mit reduzierenden Zuckern reagiert und ein säurelabiles Produkt bildet. Die höchsten Adduktgehalte wurden nach 4 Monaten im neutralen und basischen Milieu detektiert. Das Produkt konnte auch in einer Arzneimittelformulierung des DBU-Projektpartners, hergestellt mit dem Hochenergiegranulationsverfahren, nachgewiesen werden. Verunreinigungen in Arzneimitteln müssen getestet und gekennzeichnet werden. Infolgedessen wäre ein neuer Peak im Chromatogramm und die verringerte Konzentration des Wirkstoffs bei einer Zulassung aufgefallen. Um die Formulierung in ihrer Zusammensetzung zu verwenden, müssten Prozessparameter wie die Temperatur angepasst werden. Durch die Säurelabilität würde das Produkt im Magen wieder zur aktiven Substanz zurückgebildet werden und dadurch bioverfügbar sein. Dies könnte durch Verdauungsversuche bestätigt werden.

5 Experimenteller Teil

5.1 Materialien, Geräte und Chemikalien

5.1.1 Allgemein

In der folgenden Tabelle sind die Geräte und Verbrauchsmaterialien aufgeführt, die während dieser Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 5.1: Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät/Material	Modell	Hersteller
Autoklav	Laboklav 25B	SHP Steriltechnik (Detzel)
Agarplatte	Pseudomonas CFC	Thermo Scientific (Langenselbold)
BRT-MRL-Suchtest	Artikel 3030, 96well Platten mit teilbaren Streifen	Analytik in Milch (München)
Dispenser	Ceramus Classic 10 - 60 mL	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
Feinwaage	XA105 DualRange	Mettler-Toledo GmbH, (Gießen)
Glasperlen	Typ M	Behr Labor-Technik GmbH (Düsseldorf)
HPLC-UV-DAD-System		Shimadzu, Japan
• Autosampler	• SIL-10AD VP	
• Controller	• SCL-10A VP	
• Dioden Array Detektor	• SPD-M10A VP	
• Entgaser	• DGU-14A	
• Mischer	• FCV-10AL VP	
• Pumpe	• LC-10AD VP	
• Ofen	• CTO-10AC VP	
• UV/Vis Detektor	• SPD-10A VP	
HPLC-UV-FLD-System		Shimadzu, Japan
• Autosampler	• SIL-10AD VP	
• Controller	• SCL-10A VP	
• Entgaser	• DGU-14A	
• Fluoreszenz-Detektor	• RF-10A XL	
• Mischer	• FCV-10AL VP	
• Pumpe	• LC-10AD VP	
• Ofen	• CTO-10AC VP	
• UV/Vis Detektor	• SPD-10A VP	

Gerät/Material	Modell	Hersteller
HPLC-MS/MS-System		
HPLC	Dionex Ultimate 3000 RS	Thermo Scientific (Idstein)
<ul style="list-style-type: none"> • Pumpe • Autosampler • Säulenofen • UV/Vis-Detektor 	<ul style="list-style-type: none"> • Pump • Autosampler • Column Compartment • Variable Wavelength Detector 	
MS/MS	• QTRAP 3200	AB Sciex (Darmstadt)
<ul style="list-style-type: none"> • Hybrid-Massenspektrometer: Triple Quadrupole/Lineare Ionenfalle 		
HPLC-Säulen		
<ul style="list-style-type: none"> • Hypersil GOLD™ • Hypersil GOLD™ PFP • Nucleodur 100-5 C18ec 	<ul style="list-style-type: none"> • 150 x 4,6 mm, 5 µm • 150 x 4,6 mm, 5 µm • 150 x 10 mm, 5 µm 	<ul style="list-style-type: none"> • Thermo Scientific • Thermo Scientific • Macherey-Nagel (Düren)
HPLC-Vials	1,5 mL N9	Macherey-Nagel (Düren)
HPLC-Vial-Inserts	15 mm Spitze, N9, f. weite Offn. 0,2 mL, 6x31 mm, klar	Macherey-Nagel (Düren)
HPLC-Vial-Schraubdeckel	N9, blau, Loch, PTFE	Macherey-Nagel (Düren)
HPLC-Vial-Septum	Screw caps N9, blau, Loch, sil weiß, PTFE blau, geschlitzt, 1,0 mm	Macherey-Nagel (Düren)
HR-MS	Triple TOF 5600+	AB Sciex (Darmstadt)
Inkubator	Heratherm MC 18	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Kanüle	100 Sterican, (0,8-80 mm)	B. Braun (Melsungen)
Laborwaage	EW6200-2NM	Kern & Sohn (Balingen)
Magnetrührer	Lab Disc	VWR (Darmstadt)
Mikroküvetten	Polystyrol/Polystyrene 10 mm x 4 mm x 45 mm	Sarstedt Ag & Co. KG
pH-Meter	Inolab ph 730	WTW (Weilheim)
Photometer	Specord 50	Analytik Jena (Jena)
Pipetten	Transferpette	Brand (Wertheim)
<ul style="list-style-type: none"> • 10.000 µL • 5.000 µL 		

Gerät/Material	Modell	Hersteller
Pipetten <ul style="list-style-type: none"> • 1000 µL • 200 µL • 100 µL 	mLine	Sartorius (Göttingen)
Pipettenspitzen	Optifit Tips	Sartorius (Göttingen)
Pipettenspitzen (Filter) <ul style="list-style-type: none"> • 1000 µL • 200 µL 	<ul style="list-style-type: none"> • Aerosol Filter Pipet Tips • SafeSeal SurPhob 	<ul style="list-style-type: none"> • VWR International (Radnor, USA) • Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf)
Pyrolyseofen	HBA 70B550	Bosch (Gerlingen)
Reaktionsgefäße	Safe-Lock Tubes, 1,5mL, 2mL	Eppendorf (Hamburg)
Reinstwasseranlage	Arium 611VF	Sartorius (Göttingen)
Rotationsverdampfer	RV 10 digital	IKA (Staufen)
SPE-Kammer	spe-12G	J.T. Baker (Griesheim)
Spitzkolben	10 mL, 25 mL, 50 mL	Lenz Laborglas (Wertheim)
Spritzen	Injekt 5 mL, 10 mL	B. Braun (Melsungen)
Spritzenvorsatzfilter	Chromafil Pet-20/15 MS	Macherey-Nagel (Düren)
Spülmaschine	G 7883 CD	Miele & Cie. KG (Gütersloh)
Sterilbank	Safe 2020	ThermoScientific (Waltham, USA)
Thermoblock	5N00B-A	Aerne Analytic (Pfaffenhofen)
Tiefgefrierschrank	Forma 906	Thermo Fisher Scientific (Brünn)
Ultraschallbad	Ultrasonic Cleaner	VWR International (Darmstadt)
Verschlussfolie	Parafilm	Bemis, Neenah (USA)
Vortex-Gerät	Harmony Mixer UZUSIO VTX-3000L	LMS (Balingen)
Wattestäbchen	806-WC Puritan, Guilford	VWR (Darmstadt)
Werkbank	PCR Cabinet	ESCO (Friedberg)
Zentrifuge	Allegra X-15R Centrifuge	Beckman Coulter (Brea, USA)
Zentrifuge	Mircofuge® 22R	Beckman Coulter (Brea, USA)
Zentrifugenröhrchen	Falcon Tubes 15 mL, 50 mL	Greiner Bio-One (Kremsmünster, AUT)

5.1.2 Geräte und Materialien der MALDI-MS-Messung

Die Matrix-Applikation erfolgte mit SMALDIprep (TransMIT GmbH, Gießen). Als MALDI-Ionenquelle wurde AP-SMALDI5 AF (TransMIT GmbH, Gießen) verwendet. Als MS-Instrument wurde ein Q Exactive HF Orbitrap Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen)

verwendet. Als Mikroskop wurde das Keyence VHX-5000 digital microscope (Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Germany) verwendet.

5.1.3 Chemikalien

Tabelle 5.2: Chemikalien

Chemikalie	Reinheit	Hersteller
Acetonitril	HPLC Far UV/Gradient Grade	Avantor Performance Materials (Gliwice, POL)
Acetonitril	LC-MS/MS-Grade	Actu-All Chemicals (Oss, NLD)
Ameisensäure	100 %	Bernd Kraft (Duisburg)
Ammoniumacetat	> 98 %	Merck (Darmstadt)
Blutagar Base No. 2	-	Oxoid (Basingstoke, UK)
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	≥ 99,5 %	Merck (Darmstadt)
Dikaliumhydrogenphosphat	≥ 98 %	Carl Roth (Karlsruhe)
Eisen-Stammlösung AAS	1000 mg/L	Carl Roth (Karlsruhe)
Essigsäure	99-100 %	J.T. Baker (USA)
Ethanol	≥ 99,8 %	Carl Roth (Karlsruhe)
D(+)-Glucose	101,4 % auf wasserfreier Substanz	VWR Chemicals (Darmstadt)
L-Glutamin	≥ 99 %	Carl Roth (Karlsruhe)
Glycerol	100 %	Carl Roth (Karlsruhe)
Kaliumchlorid	≥ 99,5 %	Carl Roth (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat	≥ 98 %	Carl Roth (Karlsruhe)
D(+)-Lactosemonohydrat	Ph. Eur. DAB	Carl Roth (Karlsruhe)
LB-Medium (Lennox)	k. A.	Carl Roth (Karlsruhe)
Magnesiumsulfat	k. A.	Fisher Scientific, Schwerte
Methanol	Ultra-Gradient HPLC Grade	Avantor Performance Materials (Gliwice, POL)
Methanol	Ultra LC-MS	Actu-All Chemicals (Oss, NLD)
Milch, UHT, 1,5 % Fett	-	milfina
Natriumacetat-Trihydrat	≥ 99,5 %	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid	≥ 99,5 %	Merck (Darmstadt)
Natriumhydroxid	≥ 99,0	Merck (Darmstadt)
Penicillin G Standard	-	Analytik in Milch (München)
<i>o</i> -Phosphorsäure	85 %	Carl Roth (Karlsruhe)

Chemikalie	Reinheit	Hersteller
Salzsäure, rauchend	37 %	Carl Roth (Karlsruhe)
Sulfadiazin, Vetranal	99,7 %	Sigma-Aldrich (Buchs, CHE)
SDZ _{ex} , (1- <i>N</i> -(pyrimidin-2-yl)benzen-1,4-diamin)	95,0 %	Enamine (Kiew, Ukraine)
D-Sorbit, für die Biochemie	≥ 98 %	Carl Roth (Karlsruhe)
Trimethoprim, Vetranal	99,0 %	Sigma-Aldrich (Buchs, CHE)
Trimetotat® oral, Suspension 48 %	80 mg/mL TMP; 400 mg/mL SDZ	aniMedica GmbH (Livisto, Senden-Bösensell)
Tween® 20	k. A.	Carl Roth (Karlsruhe)
Tylosin-Tartrat, Vetranal	chargenabhängig: 86-90 %	Sigma Aldrich (Buchs, CHE)

5.1.3.1 Ansetzen von Stammlösungen

Für SDZ wurde eine Stammlösung in der Konzentration von 0,5 mg/mL in Methanol angesetzt. Die Stammlösung von TMP und TYL A wurde mit 1,0 mg/mL in Methanol angesetzt. Dazu wurden die Substanzen in einem Volumen von ca. 5 mL eingewogen. Nach der vollständigen Auflösung der Substanzen wurden diese in mehrere 1,5-mL-Reaktionsröhrchen aufgeteilt und im Tiefkühlschrank bei - 18 °C gelagert.

5.1.3.2 Herstellung von Lösungen für die Modellbiofilmversuche

In den folgenden Tabellen werden die Zusammensetzung und Herstellung der verschiedenen verwendeten Lösungen für Kapitel 4.3 und 4.4 aufgeführt. In Tabelle 5.3 ist dies für die verwendeten Minimalmedien dargestellt.

Tabelle 5.3: Herstellung und Zusammensetzung der Minimalmedien.

Chemikalie	Einwaage, einfach [g]	Einwaage, dreifach [g]
Dikaliumhydrogenphosphat	1,5	2,25
Glycerol	18,9	28,35
L-Glutamin	5,0	7,5
Magnesiumsulfat	0,2	0,3
Durchführung	pH-Wert auf 7,0 einstellen (mit 0,1M HCl oder 0,1M NaOH)	
	Auf 1,0 L auffüllen	Auf 0,5 L auffüllen
	Autoklavieren (siehe Tabelle 5.5)	

In Tabelle 5.4 ist die Zusammensetzung des PBS-Tween-Puffers aufgeführt.

Tabelle 5.4: Herstellung und Zusammensetzung des PBS-Tween-Puffers für 1 L.

Chemikalie	Einwaage [g]
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	1,3
Kaliumchlorid	0,2
Kaliumdihydrogenphosphat	0,2
Natriumchlorid	8,0
Tween® 20	0,1 mL
Durchführung	pH-Wert auf 7,4 einstellen (mit 0,1M HCl oder 0,1M NaOH) Autoklavieren (siehe Tabelle 5.5)

Die 0,9 %-ige Natriumchlorid-Lösung, die 80 %-ige Glycerol-Lösung und das LB-Medium, das nach Anleitung hergestellt wurde, wurden ebenfalls autoklaviert.

In Tabelle 5.5 wird das Programm zum Autoklavieren aufgeführt.

Tabelle 5.5: Programm zum Autoklavieren.

Autoklavieren	Parameter
Programm	P4 (Medien, Puffer, Flüssigkeit)
Entlüftungsphase	96 °C für 5 min
Sterilisationsphase	121 °C für 20 min
Kühlphase	Passiver Verlauf, Entnahmetemperatur: 95 °C

Zur KbE-Bestimmung der *E. coli* wurden die Agarplatten aus dem Blood Agar No. 2 von Oxoid ohne Zugabe von Blut hergestellt.

5.2 Datenauswertung und Statistik

HPLC-UV/FLD wurde mit der Software Class VP 6.13 SP1 ausgewertet. Die HPLC/UV-DAD-Auswertung erfolgte mittels Class-VP 6.14 SP2A.

Die QTRAP-Massenspektren und die Integration der Peaks wurde mit der Software Analyst® 1.6.2 durchgeführt (AB Sciex, Framingham, USA). Als weitere Geräte-Software diente Chromeleon® 6.80SR8 Build2633 und Dionex Chromatography MS Link™ 2.8.0.2633 von Dionex (Sunnyvale, CA, USA).

Für die Auswertung der QTOF-Massenspektren wurde die Software Analyst® TF 1.7.1 und PeakView® 2.2 verwendet (AB Sciex, Framingham, USA).

Bei der MALDI-MS-Messung wurden verschiedene Software zur Auswertung herangezogen: Mass Spectrometry Imaging Software Mirion 3D (Version: v3.3.64.18) vom Institut für Anorganische und Analytische Chemie der JLU Gießen, Qual Browser Thermo XCalibur (Version: 4.0.27.13, 2015) von Thermo Scientific und metaspace2020.eu mit den Datenbanken ChEBI-2018-01, Lipidmaps 2017-12-12 und HMDB - v4 (Palmer *et al.*, 2017).

Datenauswertung erfolgte mit Microsoft Excel® 2019. Mittels OriginPro 2020 (Version 9.7.0.185, Lehre) erfolgte die Statistik und die grafische Darstellung (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). Bei Vergleich von zwei bzw. mehreren Mittelwerten wurde der *t*-Test bzw. ANOVA (mit Mittelwertvergleich mittels Tukey-Tests, Homogenität der Varianz mit Levene's Test, absolut) angewendet. Wenn die Datensätze nicht die Voraussetzungen der Normalverteilung und/oder Varianzhomogenität erfüllten, wurde der Mann-Whitney-Test verwendet.

Die Biofilmversuche wurden jeweils viermal durchgeführt. Es wurden an jedem Versuchstag zwei Proben pro Rohr entnommen. Dadurch ergibt sich für jeden Probenstag eine Datenpunktzahl von $n = 8$.

5.3 HPLC-Methoden und -Validierung

5.3.1 Formeln zur Berechnung der NWG und BG nach DIN 32645

Nachweisgrenze

$$x_{NG} = s_{x_0} \cdot t_{f;a} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{Q_x}} \quad 4$$

x_{NG}	Nachweisgrenze
n	Anzahl der Kalibrierproben
m	Anzahl der Messungen an der Analysenprobe
\bar{x}	arithmetisches Mittel der Gehalte aller Kalibrierproben
$t_{f;a}$	Quantil der <i>t</i> -Verteilung bei einseitiger Fragestellung für den Fehler 1. Art
s_{x_0}	Verfahrensstandardabweichung bei Homogenität der Varianzen

$$s_{x_0} = \frac{s_{y,x}}{a} \quad 5$$

$s_{y,x}$	Reststandardabweichung der Messwerte der Kalibrierung
a	Steigung der Kalibriergerade

$$s_{y,x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2}{n-2}} \quad 6$$

y_i Messwert der Kalibrierprobe

\hat{y}_i geschätzter Funktionswert der Kalibrierprobe

$$\hat{y}_i = a \cdot x_i + b \quad 7$$

Q_x Summe der Abweichungsquadrate von x bei der Kalibrierung

$$Q_x = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad 8$$

Bestimmungsgrenze

$$x_{BG} = k \cdot s_{x_0} \cdot t_{f; \frac{\alpha}{2}} \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(k \cdot x_{NG} - \bar{x})^2}{Q_x}} \quad 9$$

x_{BG} Bestimmungsgrenze

k Ergebnisunsicherheit (k = 3)

5.3.2 SDZ und TMP

Für die Bestimmung von SDZ und TMP in Kapitel 4 und 4.4.2 wurde das HPLC-UV-FLD-System mit folgenden Parametern verwendet:

Tabelle 5.6: Messbedingungen für die HPLC-UV-Analyse von SDZ und TMP.

Parameter	Spezifikation
Säule	Hypersil Gold™ (Thermo Scientific): 150 mm x 4,60 mm; Porengröße: 5 µm
Eluent A	1 mM Ammoniumacetatlösung mit 0,5 % Ameisensäure
Eluent B	Methanol
Injektionsvolumen	10 µL
Temperatur	30 °C
Zeit	14,0 min
Flussrate	1,0 mL/min
Wellenlänge λ	270 nm

Dabei fand der Gradient aus Tabelle 5.7 Anwendung.

Tabelle 5.7: Gradient der HPLC-UV-Analyse für SDZ und TMP.

Zeit [min]	Fließmittelanteil B [%]
0	15
6,0	45
7,5	80
8,5	80
9,5	15
14,0	15

Die Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurde mittels Kalibriergeradenmethode vorgenommen: Eine Kalibriergerade wurde aus zehn äquidistanten SDZ- und TMP-Konzentrationen im Bereich von 0,05 – 0,5 µg/mL für SDZ und von 0,005 – 0,05 µg/mL für TMP erstellt. Es wurde Varianzhomogenität nachgewiesen und somit konnten die Nachweis- und Bestimmungsgrenze gemäß DIN 32645 berechnet werden (siehe Kapitel 5.3.1).

5.3.3 TYL A

5.3.3.1 HPLC-UV-Methoden für TYL

Für die Bestimmung von TYL A in Kapitel 4.2, 4.4.2.2 und 4.5 wurde das HPLC-UV-FLD-System mit folgenden Parametern verwendet:

Tabelle 5.8: Messbedingungen für die HPLC-UV-Analyse von TYL A.

Parameter	Spezifikation
Säule	Hypersil GOLD™ PFP (Thermo Scientific): 150 mm x 4,60 mm; Porengröße: 5 µm
Eluent A	52 % 1 mM Ammoniumacetatlösung mit 0,5 % Ameisensäure 48 % Methanol
Eluent B	75 % 1 mM Ammoniumacetatlösung mit 0,5 % Ameisensäure 25 % Acetonitril
Eluent C	Acetonitril
Injektionsvolumen	20 µL
Temperatur	25 °C
Zeit	23,0 min
Flussrate	1,0 mL/min
Wellenlänge λ	280 nm

Dabei wurde der Gradient aus Tabelle 5.9 angewendet.

Tabelle 5.9: Gradient der HPLC-UV-Analyse für TYL A.

Zeit [min]	Fließmittelanteil			Fluss [ml/min]
	A [%]	B [%]	C [%]	
0	100	0	0	1,0
0,1	100	0	0	1,0
3	53	47	0	1,0
11,7	0	100	0	1,0
15	0	87	13	1,0
16,6	0	73	27	1,0
18,2	100	0	0	1,0
19	100	0	0	1,5
22,8	100	0	0	1,5
23	100	0	0	1,0

Die Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurde mittels Kalibriergeradenmethode vorgenommen: Eine Kalibriergerade wurde aus zehn TYL-A-Konzentrationen im Bereich von 0,3 – 4 µg/mL erstellt. Es wurde Varianzhomogenität nachgewiesen und somit konnten die Nachweis- und Bestimmungsgrenze gemäß DIN 32645 berechnet werden (siehe Kapitel 5.3.1).

Für die Bestimmung von TYL A im Kapitel 4.5 wurde mit dem HPLC-UV-DAD-System mit den Bedingungen aus Tabelle 5.10 ein angepasster Gradient aus Tabelle 5.11 zur Detektion von TP 2 angewandt:

Tabelle 5.10: Messbedingungen für die HPLC-UV-Analyse von TYL A und TP2.

Parameter	Spezifikation
Säule	Hypersil Gold™ PFP (Thermo Scientific): 150 mm x 4,60 mm; Porengröße: 5 µm
Eluent A	58 % 1 mM Ammoniumacetatlösung mit 0,5 % Ameisensäure 42 % Methanol
Eluent B	78 % 1mM Ammoniumacetatlösung mit 0,5 % Ameisensäure 22 % Acetonitril
Eluent C	Acetonitril
Injektionsvolumen	20 µL
Temperatur	25 °C
Zeit	24,0 min
Flussrate	1,0 mL/min
Wellenlänge λ	280 nm

Tabelle 5.11: Angepasster Gradient der HPLC-UV-Analyse für TYL A und TP2.

Zeit [min]	Fließmittelanteil			Fluss [mL/min]
	A [%]	B [%]	C [%]	
0	100	0	0	1,0
1	100	0	0	1,0
3	40	60	0	1,0
7	0	100	0	1,0
11	0	100	0	1,0
14	0	96	4	1,0
16,6	0	73	27	1,0
18,2	100	0	0	1,0
19,7	100	0	0	1,0
19,8	100	0	0	1,5
23,8	100	0	0	1,5
24	100	0	0	1,0

5.3.3.2 Präparative Methode für die Isolierung von TYL-TP

Zur Isolierung der Transformationsprodukte wurden die Messbedingungen aus Tabelle 5.12 mit dem Gradienten aus Tabelle 5.13 verwendet. Die Proben wurden unmittelbar vorher steril filtriert.

Tabelle 5.12: Messbedingungen für die HPLC-UV-Analyse von TYL A und TP2.

Parameter	Spezifikation
Säule	Hypersil Gold™ PFP (Thermo Scientific): 150 mm x 4,60 mm; Porengröße: 5 µm
Eluent A	58 % 1 mM Ammoniumacetatlösung mit 0,5 % Ameisensäure 42 % Methanol
Eluent B	79 % 1 mM Ammoniumacetatlösung mit 0,5 % Ameisensäure 22 % Acetonitril
Eluent C	Acetonitril
Injektionsvolumen	100 µL
Temperatur	25 °C
Zeit	24,0 min
Flussrate	1,0 mL/min
Wellenlänge λ	260 + 280 nm

Tabelle 5.13: Gradient der HPLC-UV-Analyse zur Isolierung von TYL-TP.

Zeit [min]	Fließmittelanteil			Fluss [mL/min]
	A [%]	B [%]	C [%]	
0	100	0	0	1,0
1	100	0	0	1,0
3	40	60	0	1,0
8	0	100	0	1,0
18	0	100	0	1,0
19	0	70	30	1,0
20	0	70	30	1,0
20,5	100	0	0	1,0
19,9	100	0	0	1,0
20,0	100	0	0	1,5
23,8	100	0	0	1,5
23,8	100	0	0	1,0
24	100	0	0	1,0

5.3.3.3 LC-MS-Methoden für TYL

Die LC-MS-Messung erfolgte mit den HPLC-Bedingungen aus Tabelle 5.14 mit dem Gradienten aus Tabelle 5.15 und den MS-Parameter aus Tabelle 5.16.

Tabelle 5.14: Messbedingungen für die LC-MS-Analyse von TYL.

Parameter	Spezifikation
Säule	Hypersil Gold™ PFP (Thermo Scientific): 150 mm x 4,60 mm; Porengröße: 5 µm
Eluent A	58 % 1 mM Ammoniumacetatlösung mit 0,5 % Ameisensäure 42 % Methanol
Eluent B	76 % 1 mM Ammoniumacetatlösung mit 0,5 % Ameisensäure 24 % Acetonitril
Injektionsvolumen	5 µL
Temperatur	25 °C
Zeit	25,0 min
Flussrate	1,0 mL/min
Wellenlänge λ	260 + 280 nm

Tabelle 5.15: Gradient der LC-MS-Analyse für TYL A.

Zeit [min]	Fließmittelanteil		Fluss [mL/min]
	A [%]	B [%]	
0	100	0	1,0
1	100	0	1,0
3	40	60	1,0
11	0	100	1,0
18	0	100	1,0
21	100	0	1,0
25	100	0	1,0

Tabelle 5.16: MS-Parameter für die LC-MS-Messung von TYL.

Parameter	
Ionenquelle	Turbo Spray
Curatain Gas (CUR)	25 psi
IonSpray Voltage (IS)	5.000 V
Interface-Temperatur (TEM)	350 °C
Ion Source Gas 1 (GS1)	55 psi
Ion Source Gas 2 (GS2)	60 psi
Declustering Potential (DP)	30 V
Entrance Potential (EP)	5 V
Cell Entrance Potential (CEP)	33 V
Collision Energy (CE)	MS: 5 V MS ² : 50 V
Dwelltime	30 ms

5.4 Stabilitätsuntersuchungen von SDZ und TMP

5.4.1 Vorgehen zur Stabilitätsuntersuchung in verschiedenen wässrigen Lösungen

Für SDZ und TMP wurden jeweils zwei Stammlösungen hergestellt, die dann in 50-mL-Zentrifugenröhrchen pipettiert wurden. Daraufhin folgte der Zusatz von Reinstwasser, 0,1 %-iger Ameisensäurelösung, Phosphatpufferlösung mit einem pH-Wert von 3 oder 8 und Acetatpufferlösung mit einem pH-Wert von 5. Der Ansatz erfolgte jeweils in Doppelbestimmung. Es wurden Blindwerte der Lösungen mitgeführt. Die Lagerung erfolgte unter Lichtausschluss und unter -einfluss.

5.4.2 Vorgehen zur Stabilitätsuntersuchung in Eisen-Lösungen

Es wurden für SDZ und TMP jeweils Stammlösungen hergestellt, die dann mit einer Konzentration von 120 µg/mL für SDZ und von 80 µg/mL für TMP in 50-mL-Zentrifugenröhrchen pipettiert wurden. Nach Zugabe der Eisenlösungen ergab es nach Homogenisieren eine Lösung mit 2 mg/L und eine mit 10 mg/L. Die Lagerung erfolgte unter Lichteinfluss bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss im Kühlschrank bei 4 °C.

5.5 Methoden zur Herstellung und Untersuchung des Modellbiofilms

Die Biofilmkultivierung erfolgte in Modellrohren aus weichmacherfreiem PVC (PVC-Rohr nach DIN 8061 mit einem Durchmesser von 40,0 mm und einer Länge von 100,0 mm). Alle Arbeiten erfolgten mit autoklavierten Medien und Geräten in einer Sterilwerkbank. Dabei wurden die in Tabelle 5.17 aufgeführten Bakterienstämme verwendet:

Tabelle 5.17: Verwendete Bakterienstämme für die Biofilmversuche mit DSM- und ATCC-Nummern.

Bakterienstamm	DSM-Nummer¹	ATCC-Nummer²
<i>E. coli</i>	DSM 5210	ATCC 23631
<i>P. fluorescens</i>	DSM 50090	ATCC 13525

1) DSM: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen; <https://www.dsmz.de/>

2) ATCC: American Type Culture Collection; <https://www.atcc.org/>

5.5.1 Vorgehen zu den Untersuchungen an einem Modellbiofilm

5.5.1.1 Übersicht zum Biofilmversuchsablauf

In Abbildung 5.1 wird das Schema des Biofilmversuchsablauf dargestellt, das in den folgenden Kapiteln ausführlich besprochen wird.

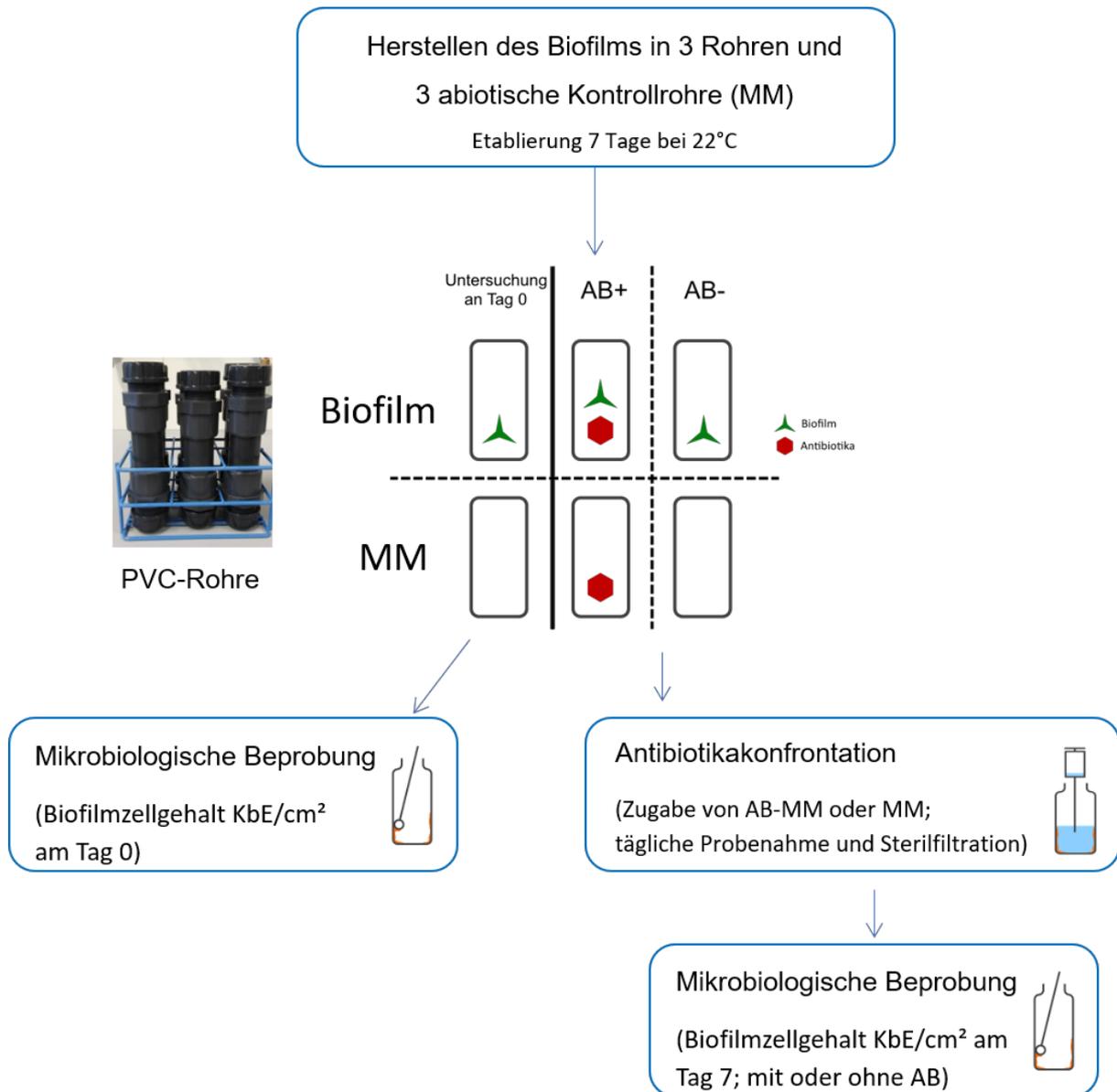


Abbildung 5.1: Übersicht zum Biofilmversuchsablauf.

5.5.1.2 Herstellung des Modellbiofilms

Die Biofilmkulturen wurden aus ihren Kryokulturen hergestellt. Dabei wurde in einen Erlenmeyerkolben 50 mL LB-Medium eingefüllt und mit *E. coli* oder *P. fluorescens* beimpft. Die Kolben mit Stopfen wurden in einem Inkubationsschrank bei 30 °C und 180 rpm geschüttelt. Nach 24 h wurde der Inhalt der Kolben in 50-mL-Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (20 °C, 3000 g, 10 min). Nachdem die Lösung dekantiert wurde, wurde mit 30 mL Minimalmedium (MM) aufgefüllt und die Bakterienzellen mittels Vortex resuspendiert. Der Vorgang mit Zentrifugieren, Dekantieren und Suspendieren mit MM wurde zweimal wiederholt.

Pro Stamm wurde aus der Suspension 1 mL entnommen und in eine Mikroküvette gefüllt für die Bestimmung der OD₆₀₀ am Photometer. Als Referenz wurde reines MM verwendet. Beide Stämme wurden dann auf einen OD₆₀₀-Wert von $0,125 \pm 0,010$ durch Verdünnen mit MM eingestellt.

In drei PVC-Rohre (DIN 8061: Länge 100,0 mm, Durchmesser 40,0 mm) wurden je 25 mL der Suspension von *E. coli* und *P. fluorescens* pipettiert. Danach wurden die Rohre vorsichtig geschwenkt. Drei weitere Rohre wurden als abiotische Kontrollen mit 50 mL reinem MM gefüllt. Für die MALDI-MS-Messung wurden die PVC-Coupons (20,0 x 20,0 mm, Ecken abgerundet) hineingehängt. Die Rohre wurden für die Sauerstoffversorgung nicht komplett geschlossen und dann in den Inkubationsschrank bei 22 °C gestellt. Die Rohre wurden 7 Tage täglich 1 min mit ca. 100 rpm geschwenkt.

5.5.1.3 Bestimmung des Zellgehaltes des Biofilms

Nach 7 Tagen wurden 2 der 6 Rohre und am Ende des Biofilmversuches die 4 übrigen Rohre zur Bestimmung der Zellzahl untersucht. Dabei wurde einmal ein Rohr mit Biofilm und ein abiotisches Kontrollrohr untersucht. Dafür wurde die Lösung aus dem Rohr entfernt und dreimal mit 50 mL einer 0,9 %-iger Natriumchloridlösung gespült. Danach wurde zur Ablösung des Biofilms 100 mL PBS-TWEEN-Lösung eingefüllt und für 10 min inkubiert. Daraufhin wurde die Lösung in 100-mL-Schottflaschen umgefüllt und die Rohre mit Wattestäbchen abgewischt. Der Wattestäbchenkopf wurde mittels Schere abgetrennt und in die Schottflasche hinzugegeben. Nach 10 min Rühren wurde 1 mL der Lösung entnommen und in einer Verdünnungsreihe bis 10^{-6} (sechsmal jeweils 1:10 verdünnt) in 15-mL-Zentrifugenröhrchen gefüllt. Die Verdünnung wurde mit 9 mL 0,9 %-iger Natriumchloridlösung durchgeführt.

Zur Bestimmung des Zellgehaltes wurden verschiedene Verdünnungsstufen in Doppelbestimmung ausplattiert. Dafür wurde 0,1 mL pro Stufe verwendet. Danach wurden ca. 8 Glasperlen hinzugefügt und zur gleichmäßigen Verteilung auf der Platte geschüttelt. *E. coli* wurde auf den selbstgegossenen Blutagar-Platten für 24 h bei 37 °C inkubiert. Für *P. fluorescens* wurde der selektive CFC-Agar verwendet und 24 h bei 30 °C inkubiert. Danach wurden die KBE auf allen Platten gezählt, wobei nur die Platten zwischen 30 und 200 Kolonien verwendet wurden.

5.5.1.4 Biofilmkonfrontation mit Antibiotika

Nach 7 Tagen der Biofilmetablierung wurde die Lösung von 4 Rohren (2 Biofilmrohre und 2 abiotische Kontrollrohre) getauscht. Ein Rohrpaar (ein Biofilmrohr und eine abiotische Kontrolle) bekam 50 mL frisches MM und ein Rohrpaar erhielt 50 mL Antibiotika-Lösung in MM mit therapeutischen Konzentrationen (SDZ/TMP: 150/30 µg/mL und TYLA: 500 µg/mL). Die Beprobung der Rohre erfolgte täglich in Doppelbestimmung. Dabei wurde mit Hilfe einer Spritze mit Kanüle 1 mL entnommen, dann mit einem Vorsatzfilter (0,22 µm) steril filtriert und bis zur

HPLC-Messung kurzfristig im Kühlschrank gelagert. Vor der HPLC-Analytik wurden die TYL-Proben 1:5 verdünnt.

5.5.1.5 Bestimmung der Zellzahl in planktonischer Lösung

Um die Zellgehalte in der Lösung der Rohre zu bestimmen wurde 1 mL Probe entnommen und mehrfach verdünnt. Von den verschiedenen Verdünnungsstufen wurden 100 µL auf zwei verschiedene Nährmedien (für *P. fluorescens* das CFC-Selektivmedium, für *E. coli* der Blutagar) ausplattiert. Nach 24 h wurden die KbE je Medium gezählt und ausgewertet.

5.5.2 Berechnung von LR und PK

Die logarithmische Reduzierung (LR) und der prozentuale Anteil der abgestorbenen Zellen (percentage killed, PK) wurde nach der Vorschrift von Hamilton (2010) berechnet.

$$LR = \log_{10}(T_{\text{abiotische Kontrolle}}) - \log_{10}(T_{\text{mit AB}}) \quad 10$$

LR logarithmische Reduzierung

T Zellgehalt (KbE/cm²)

$$SLR = \sqrt{\frac{s_{\text{abiotische Kontrolle}}^2}{n_{\text{abiotische Kontrolle}}} - \frac{s_{\text{mit AB}}^2}{n_{\text{mit AB}}}} \quad 11$$

SLR Standardabweichung der logarithmischen Reduzierung

s Standardabweichung

n Anzahl der Durchführungen

$$PK = (1 - 10^{-LR}) \cdot 100\% \quad 12$$

PK prozentualer Anteil der abgestorbenen Zellen (percentage killed)

5.5.3 Vorbereitung und Durchführung der MALDI-MS-Versuche

Die PVC-Coupons, die mit Angelseide am PVC-Rohr befestigt wurden, wurden am Anfang des Biofillexperiments verwendet. Nach der 7-tägigen Versuchsdauer mit und ohne AB wurden die Coupons mehrfach mit 0,9 %-iger Natriumchlorid-Lösung gespült und danach getrocknet. Für die Matrix-Applikation wurden 30 mg/ml 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) in Aceton/Wasser (1:1) mit 0,1 %-iger Trifluoressigsäure verwendet. Für die Desorption/Ionisation wurden die folgenden Einstellungen getroffen: 50 Laser-Pulse per Pixel bei einer Frequenz von 100 Hz (Flare NX 343-0.2-2, $\lambda = 343$ nm, Coherent, Santa Clara, USA). Die MS-Messung erfolgte mit folgenden Einstellungen:

Tabelle 5.18: MS-Parametereinstellungen für die MALDI-MS-Messungen.

Parameter	
Target voltage	3 kV
Kapillartemperatur	250 °C
Ionen-Injektionszeit	500 ms
S-lens RF level	100
Ionenmodus	Positiv
Massenbereich m/z -Verhältnisse	200 – 800; 250 – 1000

5.5.4 Isolierung von TYL-TP und Bestimmung der exakten Masse

Zur Isolierung der Transformationsprodukte wurde ein Biofilm aus *P. fluorescens* angesetzt, mit MM, das die dreifache Konzentration der Bestandteile aus Tabelle 5.3 hat, bei einer Temperatur von 22 °C oder 30 °C und mit einer TYL-A-Konzentration von 100 µg/mL, um die Gehalte von TYL B, C und D gering zu halten. Somit konnten TP1 und TP2 besser abgetrennt und in 15-mL-Zentrifugenröhrchen aufgefangen werden. Die verwendeten Parameter der HPLC sind im Kapitel 5.3.3.2 zu finden. Nach der mehrmaligen Durchführung wurden die Fraktionen am Rotationsverdampfer eingengt und in Wasser/Acetonitril (1:1) zur Bestimmung der exakten Masse aufgenommen.

Die Fraktionen wurden mittels Direktinjektion mit einer Spritzenpumpe (20 µL/min) mittels ESI⁺-TOF-MS mit den Parametern aus Tabelle 5.19 gemessen.

Tabelle 5.19: MS-Parameter für die Messung am ESI⁺-TOF-MS zur Bestimmung der exakten Masse von TYL-TP.

Parameter	Spezifikation
Ionenquelle	Duo Spray
Curtain Gas (CUR)	25 psi
IonSpray Voltage (IS)	5500 V
Interface-Temperatur (TEM)	0 °C
Ion Source Gas 1 (GS1)	20 psi
Ion Source Gas 2 (GS2)	15 psi
Declustering Potential (DP)	100 V
Collision Energy (CE)	MS: 5 V MS ² : 10 – 60 V

Die Kalibrierung des ESI⁺-TOF-MS erfolgte über m/z -Verhältnisse der Cluster einer Natriumformiatlösung nach (Juo *et al.*, 2014).

5.5.5 Kryokultivierung

Zur Konservierung der Bakterien für die Resistenzbestimmung wurden Kryokulturen angesetzt. Dafür wurden von jeder Agarplatte pro Biofilmrohr einzelne Kolonien gepickt und auf einer neuen Agarplatte ausgestrichen. *P. fluorescens* wurde bei 30 °C und *E. coli* bei 37 °C inkubiert. Nach 24 h wurden einzelne Kolonien gepickt und in 50 mL LB-Medium in Erlenmeyerkolben überführt. Nach weiteren 24 h in Schüttelinkubatoren (150 rpm, *P. fluorescens* bei 30 °C und *E. coli* bei 37 °C) wurde 1 mL der trüben Bakteriensuspension in 2-mL-Reaktionsgefäß pipettiert und zentrifugiert (5 min, 4000 rpm, 20 °C). Nach dem Dekantieren des Überstands wurde erneut 1 mL der Bakteriensuspension hinzu pipettiert und zentrifugiert. Das Bakterien-Pellet wurde mit 1 mL frischem LB-Medium suspendiert und in einem Kryoröhrchen mit 0,5 mL 80 %-igen Glycerol homogenisiert. Die Kryoröhrchen wurden 30 min in flüssigem Stickstoff tiefgekühlt und dann bei -80 °C aufbewahrt.

5.6 Methoden zum SO₂-extrudierten SDZ und dessen TP

5.6.1 Isolierung des TP in autoklavierter AB-Lösung in MM

Es wurde eine Probe mit hohem Gehalt des Transformationsproduktes von SDZ der autoklavierten Lösung ausgewählt und mittels semipräparativer HPLC nach Injektion von 100 µL das Produkt als eine Fraktion mehrfach aufgefangen. Die Fraktion wurde mithilfe des Rotationsverdampfer eingengt und in Methanol/Wasser (1:1) aufgenommen. Die HR-MS-Messung wurde als Direktinjektion mittels Spritzenpumpe durchgeführt (Parameter: Tabelle 5.19).

5.6.2 Ansetzen der Lösungen für Stabilitätsuntersuchungen

Für die Stabilitätsuntersuchungen wurden SDZ_{ex}-Lösungen mit einer Konzentration von 100 µg/mL in Methanol oder in Wasser (mit Einstellung auf verschiedene pH-Werte: 4, 7 und 10 mit 0,1 M Salzsäure oder Natronlauge) angesetzt. Daraufhin wurden von jeder wässrigen Lösung viermal 5 mL in 15-mL-Zentrifugenröhrchen pipettiert, wovon eines im Kühlschrank, eines bei 37 °C und bei Raumtemperatur eines unter und eines ohne Lichteinfluss über den Versuchszeitraum von 3 Wochen gelagert wurde. Die Stabilität der SDZ_{ex}-Lösungen in Methanol wurden im Tiefkühlschrank, Kühlschrank und bei Raumtemperatur unter und ohne Lichteinfluss über den gleichen Versuchszeitraum untersucht. Die Methanolproben wurden vor der HPLC-Messung 1:2 mit Reinstwasser verdünnt.

5.6.3 HPLC-UV-Methode

Die HPLC-Parameter und Eluenten entsprechen den im Kapitel 5.3.2 beschriebenen. Der HPLC-Gradient wurde an SDZ_{ex}, das vor SDZ eluiert, angepasst.

Tabelle 5.20: Gradient der HPLC-UV-Analyse von SDZ_{ex}.

Zeit [min]	Fließmittel B [%]	Fluss [mL/min]
0	10	1,0
4,5	90	1,0
6,0	90	1,0
6,5	10	1,0
11,0	10	1,0

5.6.4 Durchführung des BRT-MRL-Suchtests

Mit dem BRT-MRL-Suchtest von Analytik in Milch wurden SDZ_{ex} und als Referenz SDZ in Doppelbestimmung untersucht. Das Kit bestand aus mehreren Streifen mit je 8 Kavitäten, in die jeweils 100 µL einer Negativkontrolle (unbehandelte Milch), einer Positivkontrolle (4 µg/mL Penicillin G in Milch) und verschiedene Konzentrationen von SDZ und SDZ_{ex} in Milch pipettiert wurden. Dafür wurden für SDZ die Konzentrationen 0,01, 0,05, 0,10, 0,25 und 0,75 µg/mL ausgewählt und für SDZ_{ex} zusätzlich 10, 50, 100, 150 und 200 µg/mL. Daraufhin wurden die Streifen im Inkubationsblock bei 65 °C für 2,5 h inkubiert, bis sich die Negativkontrolle von blau nach gelb färbte.

Um die Hemmwirkung zu bestimmen wurden die Kavitäten photometrisch bei 450 nm und als Referenz bei 620 nm gemessen. Anhand der Formel **13** wurde die Hemmwirkung bestimmt.

$$H = \frac{MES - NC}{PC - NC} \cdot 100 \quad 13$$

H	Hemmwirkung [%]
MES	Extinktionsdifferenz der Probenkavität
NC	Extinktionsdifferenz der Negativkontrolle
PC	Extinktionsdifferenz der Positivkontrolle

5.6.5 SDZ_{ex}-Konfrontation mit dem Modellbiofilm

Der Modellbiofilm wurde wie in Kapitel 5.5.1 beschrieben hergestellt und nach 7 Tagen mit 100 µg/mL SDZ_{ex}-Lösung in MM für weitere 7 Tage konfrontiert. Die tägliche Probenahme der Rohre wurden mithilfe einer Spritze mit Kanüle durchgeführt. Danach wurde die Lösung mit

einem Spritzenvorsatzfilter (0,22 μm) steril filtriert und in 1,5-mL-Reaktionsgefäßen im Kühlschrank bis zur HPLC-Messung gelagert.

Zur Isolierung des Transformationsproduktes von SDZ_{ex} wurde eine Biofilmlösung länger gelagert und regelmäßig mit ca. 100 rpm geschwenkt. Nach 8 Wochen war SDZ_{ex} fast vollständig in das TP von SDZ_{ex} umgewandelt. Die Lösung wurde verdünnt, steril filtriert und für die Bestimmung der exakten Masse mittels der ESI⁺-TOF-MS-Messung mit der Spritzenpumpe direktinjiziert (Parameter aus Tabelle 5.19).

5.7 Methoden für den Nachweis von Interaktionen von SDZ und TMP mit reduzierenden Zuckern

5.7.1 HPLC-UV-Methode

Die HPLC-Parameter und Eluenten entsprechen den in Kapitel 5.3.2 beschriebenen. Die HPLC-UV-Methode wurde an die Analyten angepasst und mittels HPLC-UV-DAD gemessen. Dies ergab folgenden Gradienten (Tabelle 5.21).

Tabelle 5.21: Gradient der HPLC-UV-Analyse zum Nachweis einer Interaktion von SDZ und TMP mit reduzierenden Zuckern.

Zeit t [min]	Fließmittel B [%]	Fluss [mL/min]
0	10	1,0
3,5	45	1,0
5,0	80	1,0
6,0	80	1,0
7,0	10	1,0
11,5	10	1,0

5.7.2 Ansetzen der Lösungen und Versuchsdurchführung

Die Konzentrationen der einzelnen Bestandteile sollten gemäß den vom DBU-Projektpartner der TU Braunschweig verwendeten Anteilen in der Arzneimittelformulierung angepasst werden. Bei der Durchführung sollte nicht nur der von der TU Braunschweig ausgewählte reduzierende Zucker Lactose untersucht werden, sondern auch der in Veterinärapplikationen oft verwendete Hilfsstoff Glucose. Als Kontrollproben fungierten dabei der nichtreduzierende Zuckeralkohol Sorbitol und eine Lösung ohne Zusätze. Die Proben wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Dafür wurde von jeder Lösung eine Stammlösung hergestellt und danach jeweils zu ihren Anteilen in 15-mL-Zentrifugenröhrchen pipettiert (Tabelle 5.22) und der pH-Wert eingestellt werden. Die

Blindwerte wurden ohne Wirkstoffe in Einfachbestimmung mitgeführt. Während des Versuches wurden die Proben bei 37 °C im Trockenschrank inkubiert. Es erfolgte vor der HPLC-Messung eine Verdünnung von 1:5. In Tabelle 4.32 sind die Proben mit ihren Wirkstoffgehalten und Zusammensetzungen aufgeführt.

Tabelle 5.22: Substanzkonzentrationen in den angesetzten Zentrifugenröhrchen.

Substanz	Konzentration [mg/L]
SDZ	750
TMP	150
Lactose	5.918
Glucose	3.114
Sorbitol	3.149

5.7.3 Isolierung des Adduktes und Bestimmung der exakten Masse

Es wurde eine Probe mit hohem SDZ-Produkt-Gehalt ausgewählt und mittels der analytischen HPLC-UV nach Injektion von 100 µL das Produkt als Fraktion mehrfach aufgefangen. Die Fraktion wurde mittels Rotationsverdampfer eingeeengt und in Methanol/Wasser (1:1) aufgenommen. Zur Bestimmung der exakten Masse wurde die aufgenommene Probe mit der Spritzenpumpe direktinjiziert und an der ESI⁺-TOF-MS-Messung mit den Parametern aus Tabelle 5.19 gemessen.

5.7.4 Untersuchung der Arzneimittelformulierung

Die Arzneimittelformulierung des DBU-Projektpartners der TU Braunschweig bestand aus SDZ und TMP und wurde mittels Hochenergiegranulation hergestellt (Kietzmann *et al.*, 2019). Danach wurde es gesiebt und jede Fraktion untersucht. Dafür wurde 100 mg der Probe eingewogen, und diese in 0,1 M Natriumhydroxidlösung gelöst. Vor der HPLC-UV-Messung wurde eine 1:10-Verdünnung mit Wasser durchgeführt.

6 Literaturverzeichnis

- Aarestrup, F. M. (1999). Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 12(4), 279–285. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(99\)90059-6](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(99)90059-6)
- AB Sciex™. (2018a). 3200 Series of instruments, system user guide, RUO-IDV-05-6475-A. *Produkte*, letzter Zugriff am 05.08.2023. <https://sciex.com/content/dam/SCIEX/pdf/customer-docs/user-guide/3200-system-user-guide-en.pdf>
- AB Sciex™. (2018b). TripleTOF® 5600+ System, Systemhandbuch, RUO-IDV-05-7040-DE-B. *Produkte*, letzter Zugriff am 05.08.2023. <https://sciex.com/content/dam/SCIEX/pdf/customer-docs/user-guide/5600-system-user-guide-de.pdf>
- AB Sciex™. (2020). TripleTOF® 6600+ LC-MS/MS System: Powerful. Productive. Versatile. RUO-MKT-07-5941-B. *AB Sciex Brochures*, letzter Zugriff am 05.08.2023. <https://sciex.com/content/dam/SCIEX/pdf/brochures/TripleTOF-6600-Flyer.pdf>
- Abrantes, C. G., Duarte, D., & Reis, C. P. (2016). An overview of pharmaceutical excipients: Safe or not safe? *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105(7), 2019–2026. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.03.019>
- Acosta-Rangel, A., Sánchez-Polo, M., Rozalen, M., Rivera-Utrilla, J., Polo, A. M. S., & Mota, A. J. (2019). Comparative study of the oxidative degradation of different 4-Aminobenzene sulfonamides in aqueous solution by sulfite activation in the presence of Fe(0), Fe(II), Fe(III) or Fe(VI). *Water (Switzerland)*, 11(11), 2332. <https://doi.org/10.3390/w11112332>
- AMG. (2016). *Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln (Arzneimittelgesetz – AMG); in der Fassung der Bekanntmachung vom 12. Dezember 2005 (BGBl. I S. 3394), das zuletzt durch Artikel 9 des Gesetzes vom 3. Juni 2021 (BGBl. I S. 1309) geändert worden ist.*
- Amyes, S. G. B., & Smith, J. T. (1975). Thymineless mutants and their resistance to trimethoprim. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1(1), 85–89. <https://doi.org/10.1093/jac/1.1.85>
- Analytik in Milch. (2020a). Der Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT) - Agar-Diffusions-Verfahren zum Nachweis von Hemmstoffen und Tierarzneimittel-Rückständen in Milch und Milchprodukten. *Hemmstoffsysteme - Informationen*, letzter Zugriff am 05.08.2023. https://www.aim-bayern.de/pdf/BRT_Produktinformation_08-2020.pdf
- Analytik in Milch. (2020b). Der Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT) - Basisinformationen und Hintergründe. *Hemmstoffsysteme - Informationen*, letzter Zugriff am 05.08.2023. https://www.aim-bayern.de/pdf/BRT_Basisinformationen_und_Hintergruende_08-2020.pdf
- Andersson, D. I., & Hughes, D. (2014). Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nature Reviews Microbiology*, 12(7), 465–478. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3270>
- Arsic, B., Barber, J., Čikoš, A., Mladenovic, M., Stankovic, N., & Novak, P. (2018). 16-membered macrolide antibiotics: A review. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 51(3), 283–298. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.05.020>
- Artinger, R., Buckau, G., Geyer, S., Fritz, P., Wolf, M., & Kim, J. I. (2000). Characterization of groundwater humic substances: Influence of sedimentary organic carbon. *Applied Geochemistry*, 15(1), 97–116. [https://doi.org/10.1016/S0883-2927\(99\)00021-9](https://doi.org/10.1016/S0883-2927(99)00021-9)
- Ashenafi, D., Hoogmartens, J., & Adams, E. (2011). An improved liquid chromatographic method for the analysis of tylosin and its impurities. *Journal of Separation Science*, 34(19), 2631–2638. <https://doi.org/10.1002/jssc.201100340>
- Balakrishnan, V. K., Terry, K. A., & Toito, J. (2006). Determination of sulfonamide antibiotics in

- wastewater: A comparison of solid phase microextraction and solid phase extraction methods. *Journal of Chromatography A*, 1131(1–2), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.07.011>
- Baran, W., Adamek, E., Ziemiańska, J., & Sobczak, A. (2011). Effects of the presence of sulfonamides in the environment and their influence on human health. *Journal of Hazardous Materials*, 196, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.08.082>
- Barthélémy, P., Autissier, D., Gerbaud, G., & Courvalin, P. (1984). Enzymic hydrolysis of erythromycin by a strain of *Escherichia coli*. A new mechanism of resistance. *The Journal of Antibiotics*, 37(12), 1692–1696. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.37.1692>
- Baumann, M., Weiss, K., Maletzki, D., Schüssler, W., Schudoma, D., Kopf, W., & Kühnen, U. (2015). Aquatic toxicity of the macrolide antibiotic clarithromycin and its metabolites. *Chemosphere*, 120, 192–198. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.05.089>
- BfR. (2022). *Therapiehäufigkeit und Antibiotikaverbrauchsmengen 2018–2021: Entwicklung in zur Fleischerzeugung gehaltenen Rindern, Schweinen, Hühnern und Puten*. Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR). letzter Zugriff am 05.08.2023. <https://www.bfr.bund.de/cm/343/therapiehaeufigkeit-und-antibiotikaverbrauchsmengen-2018-2021-bericht.pdf>
- Białk-Bielińska, A., Stolte, S., Matzke, M., Fabiańska, A., Maszkowska, J., Kołodziejska, M., Liberek, B., Stepnowski, P., & Kumirska, J. (2012). Hydrolysis of sulphonamides in aqueous solutions. *Journal of Hazardous Materials*, 221–222, 264–274. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.04.044>
- Bienz, S., Bigler, L., Fox, T., & Meier, H. (Eds.). (2016). *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie* (9. Auflage). Georg Thieme Verlag. Stuttgart. <https://doi.org/10.1055/b-004-129729>
- Billings, N., Ramirez Millan, M., Caldara, M., Rusconi, R., Tarasova, Y., Stocker, R., & Ribbeck, K. (2013). The extracellular matrix component Psl provides fast-acting antibiotic defense in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathogens*, 9(8), e1003526. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003526>
- Biošić, M., & Babić, S. (2020). Trimethoprim elimination by biotic and abiotic processes. *Fresenius Environmental Bulletin*, 29(9A), 7972. <https://doi.org/10.1142/7114>
- Biošić, M., Mitrevski, M., & Babić, S. (2017). Environmental behavior of sulfadiazine, sulfamethazine, and their metabolites. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(10), 9802–9812. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8639-8>
- Blackman, L. D., Qu, Y., Cass, P., & Locock, K. E. S. (2021). Approaches for the inhibition and elimination of microbial biofilms using macromolecular agents. *Chemical Society Reviews*, 50(3), 1587–1616. <https://doi.org/10.1039/d0cs00986e>
- Block, J. C. (1992). Biofilms in drinking water distribution systems. In L. F. Melo, T. R. Bott, M. Fletcher, & B. Capdeville (Eds.), *Biofilms - Science and Technology* (Vol. 223, pp. 469–485). Springer Netherlands. Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-011-1824-8_42
- Boesl, U. (2017). Time-of-flight mass spectrometry: Introduction to the basics. *Mass Spectrometry Reviews*, 36(1), 86–109. <https://doi.org/10.1002/mas.21520>
- Böger, R., Rohn, K., Kemper, N., & Schulz, J. (2020). Sodium hypochlorite treatment: The impact on bacteria and endotoxin concentrations in drinking water pipes of a pig nursery. *Agriculture*, 10(3), 86. <https://doi.org/10.3390/agriculture10030086>
- Boreen, A. L., Arnold, W. A., & McNeill, K. (2005). Triplet-sensitized photodegradation of sulfa drugs containing six-membered heterocyclic groups: Identification of an SO₂ extrusion photoproduct. *Environmental Science & Technology*, 39(10), 3630–3638. <https://doi.org/10.1021/es048331p>

- Borkar, R. P., Gulhane, M. L., & Kotangale, A. J. (2013). Moving bed biofilm reactor – a new perspective in wastewater treatment. *IOSR Journal Of Environmental Science, Toxicology And Food Technology*, 6(6), 15–21. <https://doi.org/10.9790/2402-0661521>
- Breidenstein, E. B. M., de la Fuente-Núñez, C., & Hancock, R. E. W. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: All roads lead to resistance. *Trends in Microbiology*, 19(8), 419–426. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.04.005>
- Buckingham-Meyer, K., Goeres, D. M., & Hamilton, M. A. (2007). Comparative evaluation of biofilm disinfectant efficacy tests. *Journal of Microbiological Methods*, 70(2), 236–244. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.04.010>
- Budzikiewicz, H. (1997). Siderophores of fluorescent pseudomonads. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 52(11–12), 713–720. <https://doi.org/10.1515/znc-1997-11-1201>
- Bushby, M., & Hitchings, G. H. (1968). Trimethoprim, a sulphonamide potentiator. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, 90(1), 72–90. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1968.tb00475.x>
- BVL und BfR. (2022). *Arbeitsgruppe Antibiotikaresistenz des Bundesamts für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) und des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR): Lagebild zur Antibiotikaresistenz im Bereich Tierhaltung und Lebensmittelkette 2021*. letzter Zugriff am 05.08.2023. https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/DE/_Tiere/Tiergesundheit/Tierarzneimittel/lagebild-antibiotikaeinsatz-bei-tieren-2021.pdf?__blob=publicationFile&v=3
- Cao, B., Christophersen, L., Kolpen, M., Jensen, P. Ø., Sneppen, K., Høiby, N., Moser, C., & Sams, T. (2016). Diffusion retardation by binding of tobramycin in an alginate biofilm model. *PLOS ONE*, 11(4), e0153616. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153616>
- Carrascosa, C., Raheem, D., Ramos, F., Saraiva, A., & Raposo, A. (2021). Microbial biofilms in the food industry - a comprehensive review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(4), 2014. <https://doi.org/10.3390/ijerph18042014>
- Caruso, G. (2018). Antibiotic resistance in *Escherichia coli* from farm livestock and related analytical methods: A review. *Journal of AOAC International*, 101(4), 916–922. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0445>
- Carvalho, I. T., & Santos, L. (2016). Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario. *Environment International*, 94, 736–757. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.06.025>
- Chadha, R., & Bhandari, S. (2014). Drug-excipient compatibility screening - Role of thermoanalytical and spectroscopic techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 87, 82–97. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.06.016>
- Chang, Y. W., Fragkopoulos, A. A., Marquez, S. M., Kim, H. D., Angelini, T. E., & Fernández-Nieves, A. (2015). Biofilm formation in geometries with different surface curvature and oxygen availability. *New Journal of Physics*, 17. <https://doi.org/10.1088/1367-2630/17/3/033017>
- Characklis, W. G. (1973). Attached microbial growths—II. Frictional resistance due to microbial slimes. *Water Research*, 7(9), 1249–1258. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(73\)90002-X](https://doi.org/10.1016/0043-1354(73)90002-X)
- Chatterjee, S., Biswas, N., Datta, A., Dey, R., & Maiti, P. (2014). Atomic force microscopy in biofilm study. *Microscopy*, 63(4), 269–278. <https://doi.org/10.1093/jmicro/dfu013>
- Chien, H. W., Chen, X. Y., Tsai, W. P., & Lee, M. (2020). Inhibition of biofilm formation by rough shark skin-patterned surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 186(October 2019), 110738. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110738>

- Chimileski, S., Franklin, M. J., & Papke, R. T. (2014). Biofilms formed by the archaeon *Haloferax volcanii* exhibit cellular differentiation and social motility, and facilitate horizontal gene transfer. *BMC Biology*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s12915-014-0065-5>
- Choi, N.-Y., Kim, B.-R., Bae, Y.-M., & Lee, S.-Y. (2013). Biofilm formation, attachment, and cell hydrophobicity of foodborne pathogens under varied environmental conditions. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 56(2), 207–220. <https://doi.org/10.1007/s13765-012-3253-4>
- Chopra, S., Van Schepdael, A., Hoogmartens, J., & Adams, E. (2013). Characterization of impurities in tylosin using dual liquid chromatography combined with ion trap mass spectrometry. *Talanta*, 106, 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.12.008>
- Chow, L. K. M., Ghaly, T. M., & Gillings, M. R. (2021). A survey of sub-inhibitory concentrations of antibiotics in the environment. *Journal of Environmental Sciences*, 99, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2020.05.030>
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, CLSI document M07-A9* (9th ed., Vol. 32, Issue 2). Wayne, Pennsylvania, USA.
- Conde-Cid, M., Fernández-Calviño, D., Nóvoa-Muñoz, J. C., Arias-Estévez, M., Díaz-Raviña, M., Núñez-Delgado, A., Fernández-Sanjurjo, M. J., & Álvarez-Rodríguez, E. (2018). Degradation of sulfadiazine, sulfachloropyridazine and sulfamethazine in aqueous media. *Journal of Environmental Management*, 228, 239–248. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.09.025>
- Connor, E. E. (1998). Sulfonamide antibiotics. *Primary Care Update for OB/GYNs*, 5(1), 32–35. [https://doi.org/10.1016/S1068-607X\(97\)00121-2](https://doi.org/10.1016/S1068-607X(97)00121-2)
- Cook, L. E., & Hildebrand, D. A. (1974). The thermogravimetry of sulfanilamide and related sulfa drugs. *Thermochimica Acta*, 9(2), 129–133. [https://doi.org/10.1016/0040-6031\(74\)85005-7](https://doi.org/10.1016/0040-6031(74)85005-7)
- Cornish, T. J., & Cotter, R. J. (1993). Collision-induced dissociation in a tandem time-of-flight mass spectrometer with two single-stage reflectrons. *Organic Mass Spectrometry*, 28(10), 1129–1134. <https://doi.org/10.1002/oms.1210281025>
- Costa, E. P., Roccamante, M., Amorim, C. C., Oller, I., Sánchez Pérez, J. A., & Malato, S. (2020). New trend on open solar photoreactors to treat micropollutants by photo-Fenton at circumneutral pH: Increasing optical pathway. *Chemical Engineering Journal*, 385, 123982. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.123982>
- Costanzo, S. D., Murby, J., & Bates, J. (2005). Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. *Marine Pollution Bulletin*, 51(1–4), 218–223. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.10.038>
- Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M., & Marrie, T. J. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Review of Microbiology*, 41, 435–464. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.41.100187.002251>
- Cowan, M. M., Warren, T. M., & Fletcher, M. (1991). Mixed-species colonization of solid surfaces in laboratory biofilms. *Biofouling*, 3(1), 23–34. <https://doi.org/10.1080/08927019109378159>
- Dalton, H. M., Poulsen, L. K., Halasz, P., Angles, M. L., Goodman, A. E., & Marshall, K. C. (1994). Substratum-induced morphological changes in a marine bacterium and their relevance to biofilm structure. *Journal of Bacteriology*, 176(22), 6900–6906. <https://doi.org/10.1128/jb.176.22.6900-6906.1994>
- Demanèche, S., Kay, E., Gourbière, F., & Simonet, P. (2001). Natural transformation of *Pseudomonas fluorescens* and *Agrobacterium tumefaciens* in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6),

2617–2621. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.6.2617-2621.2001>

- Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina. (2012). *Antibiotika-Forschung: Probleme und Perspektiven* (Akademie der Wissenschaften in Hamburg & Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina (Eds.)). DE GRUYTER. Berlin, Boston. <https://doi.org/10.1515/9783110306897>
- Dewanti, R., & Wong, A. C. L. (1995). Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology*, 26(2), 147–164. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)00103-D](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)00103-D)
- di Biase, A., Kowalski, M. S., Devlin, T. R., & Oleszkiewicz, J. A. (2019). Moving bed biofilm reactor technology in municipal wastewater treatment: A review. *Journal of Environmental Management*, 247(June), 849–866. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.06.053>
- Dias, I. N., Souza, B. S., Pereira, J. H. O. S., Moreira, F. C., Dezotti, M., Boaventura, R. A. R., & Vilar, V. J. P. (2014). Enhancement of the photo-Fenton reaction at near neutral pH through the use of ferrioxalate complexes: A case study on trimethoprim and sulfamethoxazole antibiotics removal from aqueous solutions. *Chemical Engineering Journal*, 247, 302–313. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.03.020>
- Díaz-Cruz, M. S., García-Galán, M. J., & Barceló, D. (2008). Highly sensitive simultaneous determination of sulfonamide antibiotics and one metabolite in environmental waters by liquid chromatography-quadrupole linear ion trap-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1193(1–2), 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.03.029>
- Diggle, S. P., Matthijs, S., Wright, V. J., Fletcher, M. P., Chhabra, S. R., Lamont, I. L., Kong, X., Hider, R. C., Cornelis, P., Cámara, M., & Williams, P. (2007). The *Pseudomonas aeruginosa* 4-quinolone signal molecules HHQ and PQS play multifunctional roles in quorum sensing and iron entrapment. *Chemistry & Biology*, 14(1), 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2006.11.014>
- DIN 32645. (2008). *Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung*. Deutsches Institut für Normung e. V. (DIN). <https://doi.org/10.31030/1465413>
- Dinos, G. P. (2017). The macrolide antibiotic renaissance. *British Journal of Pharmacology*, 174(18), 2967–2983. <https://doi.org/10.1111/bph.13936>
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881–890. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>
- Donnarumma, G., Buommino, E., Fusco, A., Paoletti, I., Auricchio, L., & Tufano, M. A. (2010). Effect of temperature on the shift of *Pseudomonas fluorescens* from an environmental microorganism to a potential human pathogen. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 23(1), 227–234. <https://doi.org/10.1177/039463201002300120>
- Doroshenko, V. M., Laiko, V. V., Taranenko, N. I., Berkout, V. D., & Lee, H. S. (2002). Recent developments in atmospheric pressure MALDI mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 221(1), 39–58. [https://doi.org/10.1016/S1387-3806\(02\)00893-X](https://doi.org/10.1016/S1387-3806(02)00893-X)
- Dynes, J. J., Lawrence, J. R., Korber, D. R., Swerhone, G. D. W., Leppard, G. G., & Hitchcock, A. P. (2009). Morphological and biochemical changes in *Pseudomonas fluorescens* biofilms induced by sub-inhibitory exposure to antimicrobial agents. *Canadian Journal of Microbiology*, 55(2), 163–178. <https://doi.org/10.1139/W08-109>
- Edberg, S. C., Rice, E. W., Karlin, R. J., & Allen, M. J. (2000). *Escherichia coli*: The best biological drinking water indicator for public health protection. *Journal of Applied Microbiology*, 88(S1), 106S–116S. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2000.tb05338.x>
- EDQM. (2023). *Harmonisation status for excipient monographs (PDG)*. European directorate for the quality

- of medicines & healthcare (EDQM). letzter Zugriff am 05.08.2023.
<https://www.edqm.eu/en/harmonisation-status-excipient-monographs-pdg>
- Eliopoulos, G. M., & Huovinen, P. (2001). Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole. *Clinical Infectious Diseases*, 32(11), 1608–1614. <https://doi.org/10.1086/320532>
- Escolà Casas, M., Chhetri, R. K., Ooi, G., Hansen, K. M. S., Litty, K., Christensson, M., Kragelund, C., Andersen, H. R., & Bester, K. (2015). Biodegradation of pharmaceuticals in hospital wastewater by staged Moving Bed Biofilm Reactors (MBBR). *Water Research*, 83, 293–302.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.06.042>
- Europäische Kommission. (2020). „Vom Hof auf den Tisch“ – eine Strategie für ein faires, gesundes und umweltfreundliches Lebensmittelsystem (COM/2020/381 final). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?uri=CELEX:52020DC0381>
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility (EUCAST). (2023). *MIC and zone diameter distributions and ECOFFs*. letzter Zugriff am 05.08.2023.
http://www.eucast.org/mic_distributions_and_ecoffs
- Fathima, N., Mamatha, T., Qureshi, H. K., Anitha, N., & Venkateswara Rao, J. (2011). Drug-excipient interaction and its importance in dosage form development. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1(6), 66–71.
- Fazli, M., Almlad, H., Rybtke, M. L., Givskov, M., Eberl, L., & Tolker-Nielsen, T. (2014). Regulation of biofilm formation in *Pseudomonas* and *Burkholderia* species. *Environmental Microbiology*, 16(7), 1961–1981. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12448>
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., & Wong, S. F. (1990). Electrospray ionization-principles and practice. *Mass Spectrometry Reviews*, 9, 37–70.
- Flemming, H.-C. (2006). Biofilme: eine Gefahr für das Trinkwasser? *Gwa*, 6, 481–486.
- Flemming, H.-C. (2011). The perfect slime. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 86(2), 251–259.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.04.025>
- Flemming, H.-C. (2020). Biofouling and me: My Stockholm syndrome with biofilms. *Water Research*, 173, 115576. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115576>
- Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2001). Biofilme - die bevorzugte Lebensform der Bakterien: Flocken, Filme und Schlämme. *Biologie in Unserer Zeit*, 31(3), 169–180. Weinheim, Germany.
[https://doi.org/10.1002/1521-415X\(200105\)31:3<169::AID-BIUZ169>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1521-415X(200105)31:3<169::AID-BIUZ169>3.0.CO;2-U)
- Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2002). Was Biofilme zusammenhält. *Chemie in Unserer Zeit*, 36(1), 30–42. [https://doi.org/10.1002/1521-3781\(200202\)36:1<30::AID-CIUZ30>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/1521-3781(200202)36:1<30::AID-CIUZ30>3.0.CO;2-O)
- Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 19(2), 139–150.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563–575.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Freissmuth, M., Offermanns, S., & Böhm, S. (2020). *Pharmakologie und Toxikologie* (3. Auflage). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-58304-3>
- Freitas, M. N., Alves, R., Matos, J. R., & Marchetti, J. M. (2007). Thermal analysis applied in the osmotic tablets pre-formulation studies. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 87(3), 905–911.
<https://doi.org/10.1007/s10973-006-7710-3>

- Fritsche, O. (2016). *Mikrobiologie* (1. Auflage). Springer Spektrum Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-49729-6>
- FVE. (2016). Antimicrobial use in food-producing animals. Replies to EFSA/EMA questions on the use of antimicrobials in food-producing animals in EU and possible measures to reduce antimicrobial use. *Federation of Veterinarians of Europe (FVE): FVE/016/DOC/010*, letzter Zugriff am 05.08.2023. https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/annex-replies-efsa/ema-questions-use-antimicrobials-food-producing-animals-eu-possible-measures-reduce-antimicrobial_en.pdf
- García-Galán, M. J., Rodríguez-Rodríguez, C. E., Vicent, T., Caminal, G., Díaz-Cruz, M. S., & Barceló, D. (2011). Biodegradation of sulfamethazine by *Trametes versicolor*: Removal from sewage sludge and identification of intermediate products by UPLC-QqTOF-MS. *Science of the Total Environment*, 409(24), 5505–5512. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.08.022>
- García-Galán, M. J., Silvia Díaz-Cruz, M., & Barceló, D. (2008). Identification and determination of metabolites and degradation products of sulfonamide antibiotics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27(11), 1008–1022. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.10.001>
- Gaynor, M., & Mankin, A. (2005). Macrolide antibiotics: Binding site, mechanism of action, resistance. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 3(9), 949–960. <https://doi.org/10.2174/1568026033452159>
- Geisen, K., Taraz, K., & Budzikiewicz, H. (1992). Neue Siderophore des Pyoverdine-Typs aus *Pseudomonas fluorescens*. *Monatshefte Für Chemie*, 123(1–2), 151–178. <https://doi.org/10.1007/BF01045308>
- Gey, M. H. (2021). *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik* (4. Auflage). Springer Spektrum Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-63952-8>
- Ghosh, A., Jayaraman, N., & Chatterji, D. (2020). Small-molecule inhibition of bacterial biofilm. *ACS Omega*, 5(7), 3108–3115. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b03695>
- Givens, R. S., Hrcinczenko, B., Liu, J. H. S., Tholen-Collison, J., & Matuszewski, B. (1984). Photoextrusion of SO₂ from arylmethyl sulfones: Exploration of the mechanism by chemical trapping, chiral, and CIDNP probes. *Journal of the American Chemical Society*, 106(6), 1779–1789. <https://doi.org/10.1021/ja00318a037>
- Goeres, D. M., Walker, D. K., Buckingham-Meyer, K., Lorenz, L., Summers, J., Fritz, B., Goveia, D., Dickerman, G., Schultz, J., & Parker, A. E. (2019). Development, standardization, and validation of a biofilm efficacy test: The single tube method. *Journal of Microbiological Methods*, 165(October), 105694. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.105694>
- Gomes, I. B., Simões, L. C., & Simões, M. (2018). The effects of emerging environmental contaminants on *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from drinking water in planktonic and sessile states. *Science of The Total Environment*, 643, 1348–1356. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.263>
- Gonçalves, L. D. dos A., Piccoli, R. H., Peres, A. de P., & Saúde, A. V. (2017). Predictive modeling of *Pseudomonas fluorescens* growth under different temperature and pH values. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(2), 352–358. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.12.006>
- González-Pleiter, M., Gonzalo, S., Rodea-Palomares, I., Leganés, F., Rosal, R., Boltes, K., Marco, E., & Fernández-Piñas, F. (2013). Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: Implications for environmental risk assessment. *Water Research*, 47(6), 2050–2064. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.01.020>
- Gray, P. P., & Vu-Trong, K. (1987). Production of the macrolide antibiotic tylosin in cyclic fed-batch culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 29(1), 33–40. <https://doi.org/10.1002/bit.260290106>
- Gross, J. H. (2013). *Massenspektrometrie: Ein Lehrbuch* (1. Auflage). Springer Spektrum Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2981-0>

- Gross, J. H. (2019). *Massenspektrometrie* (1. Auflage). Springer Spektrum Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-58635-8>
- GrwV. (2010). *Verordnung zum Schutz des Grundwassers (Grundwasserverordnung - GrwV) vom 9. November 2010 (BGBl. I S. 1513), die zuletzt durch Artikel 1 der Verordnung vom 12. Oktober 2022 (BGBl. I S. 1802) geändert worden ist.*
- Gunther IV, N. W., & Chen, C.-Y. (2009). The biofilm forming potential of bacterial species in the genus *Campylobacter*. *Food Microbiology*, 26(1), 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.07.012>
- Guo, X., Yang, C., Wu, Y., & Dang, Z. (2014). The influences of pH and ionic strength on the sorption of tylosin on goethite. *Environmental Science and Pollution Research*, 21, 2572–2580. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2174-z>
- Hahne, F., Jensch, S., Hamscher, G., Meißner, J., Kietzmann, M., Kemper, N., Schulz, J., & Mateus-Vargas, R. H. (2022). Innovative perspectives on biofilm interactions in poultry drinking water systems and veterinary antibiotics used worldwide. *Antibiotics*, 11(1), 77. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11010077>
- Hahne, F., Müller, C., Yalman, S., Meißner, J., Kietzmann, M., & Hamscher, G. (2023). Stability of Important Veterinary Antibiotics Amoxicillin, Sulfadiazine, and Trimethoprim in Practice-Relevant Model Solutions. *Antibiotics*, 12(2), 214. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020214>
- Hamilton, M. A. (2010). KSA-SM-07—The log reduction (LR) measure of disinfectant efficacy. *Center for Biofilm Engineering at Montana State University, Bozeman, MT; Knowledge Sharing Articles*, letzter Zugriff am 29.07.2022. <https://biofilm.montana.edu/documents/KSA-SM-07.pdf>
- Hamscher, G., Sczesny, S., Höper, H., & Nau, H. (2002). Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 74(7), 1509–1518. <https://doi.org/10.1021/ac015588m>
- Hancock, R. E. W. (1998). Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clinical Infectious Diseases*, 27, S93–S99. <https://doi.org/10.1086/514909>
- Hancock, R. E. W., & Speert, D. P. (2000). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Mechanisms and impact on treatment. *Drug Resistance Updates*, 3(4), 247–255. <https://doi.org/10.1054/drup.2000.0152>
- Hannappel, S., Köpp, C., & Zühlke, S. (2016). Aufklärung der Ursachen von Tierarzneimittelfunden im Grundwasser – Untersuchung eintragsgefährdeter Standorte in Norddeutschland. *Umweltbundesamt, Texte: 54/2016*. <http://www.umweltbundesamt.de/publikationen/aufklaerung-der-ursachen-von-tierarzneimittelfunden>
- Harmon, P. A., Yin, W., Bowen, W. E., Tyrrell, R. J., & Reed, R. A. (2000). Liquid chromatography-mass spectrometry and proton nuclear magnetic resonance characterization of trace level condensation products formed between lactose and the amine-containing diuretic hydrochlorothiazide. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 89(7), 920–929. [https://doi.org/10.1002/1520-6017\(200007\)89:7<920::AID-JPS9>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1520-6017(200007)89:7<920::AID-JPS9>3.0.CO;2-W)
- Harris, D. C. (2014). *Lehrbuch der Quantitativen Analyse* (G. Werner & T. Werner (Eds.); 8. Auflage). Springer Spektrum Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-37788-4>
- Hasan, N., Gopal, J., & Wu, H.-F. (2011). Rapid, sensitive and direct analysis of exopolysaccharides from biofilm on aluminum surfaces exposed to sea water using MALDI-TOF MS. *Journal of Mass Spectrometry*, 46(11), 1160–1167. <https://doi.org/10.1002/jms.2003>
- Hathroubi, S., Mekni, M. A., Domenico, P., Nguyen, D., & Jacques, M. (2017). Biofilms: Microbial shelters

- against antibiotics. *Microbial Drug Resistance*, 23(2), 147–156.
<https://doi.org/10.1089/mdr.2016.0087>
- Hemdan, B. A., El-Taweel, G. E., Goswami, P., Pant, D., & Sevda, S. (2021). The role of biofilm in the development and dissemination of ubiquitous pathogens in drinking water distribution systems: An overview of surveillance, outbreaks, and prevention. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(2). <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03008-3>
- Heuer, H., Focks, A., Lamshöft, M., Smalla, K., Matthies, M., & Spiteller, M. (2008). Fate of sulfadiazine administered to pigs and its quantitative effect on the dynamics of bacterial resistance genes in manure and manured soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(7), 1892–1900.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.03.014>
- Heydorn, A., Nielsen, A. T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersbøll, B. K., & Molin, S. (2000). Quantification of biofilm structures by the novel computer program comstat. *Microbiology*, 146(10), 2395–2407. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-10-2395>
- Hillenkamp, F., & Peter-Katalinic, J. (Eds.). (2013). *MALDI MS: A practical guide to instrumentation, methods, and applications* (2. Auflage). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim, Germany.
<https://doi.org/10.1002/9783527335961>
- Högberg, L. D., Heddini, A., & Cars, O. (2010). The global need for effective antibiotics: Challenges and recent advances. *Trends in Pharmacological Sciences*, 31(11), 509–515.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2010.08.002>
- Homem, V., & Santos, L. (2011). Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices – A review. *Journal of Environmental Management*, 92(10), 2304–2347.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.05.023>
- Honmane, S. M., Dange, Y. D., Osmani, R. A. M., & Judge, D. R. (2017). General considerations of design and development of dosage forms: Pre-formulation review. *Asian Journal of Pharmaceutics*, 11(3), S479–S488.
- Hsu, F. F., Nodari, F., Kao, L. F., Fu, X., Holekamp, T. F., Turk, J., & Holy, T. E. (2008). Structural characterization of sulfated steroids that activate mouse pheromone-sensing neurons. *Biochemistry*, 47(52), 14009–14019. <https://doi.org/10.1021/bi801392j>
- Hu, D., & Coats, J. R. (2007). Aerobic degradation and photolysis of tylosin in water and soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(5), 884–889. <https://doi.org/10.1038/ijos.2013.76>
- Hugh, R., Guarraia, L., & Hatt, H. (1964). The proposed neotype strains of *Pseudomonas fluorescens* (Trevisan) Migula 1895. *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy*, 14(4), 145–156. <https://doi.org/10.1099/0096266X-14-4-145>
- Huovinen, P. (1987). Trimethoprim resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 31(10), 1451–1456. <https://doi.org/10.1128/AAC.31.10.1451>
- ICH. (2003). Quality Guideline: ICH Q1A (R2). Stability testing of new drug substances and products. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). *CPMP/ICH/2736/99*. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-1-r2-stability-testing-new-drug-substances-products-step-5_en.pdf
- Ichimiya, T., Takeoka, K., Hiramatsu, K., Hirai, K., Yamasaki, T., & Nasu, M. (1996). The influence of azithromycin on the biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *Chemotherapy*, 42(3), 186–191. <https://doi.org/10.1159/000239440>
- IPEC. (2010). *The IPEC Excipient Stability Program Guide*. International Pharmaceutical Excipients Council (IPEC).

- IPEC. (2020). *Qualification of excipients for use in pharmaceuticals. Guide & checklist. Second version. International Pharmaceutical Excipients Council (IPEC).*
- Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Pascarella, L., & Parrella, A. (2005). Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. *Science of the Total Environment*, 346(1–3), 87–98. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.11.017>
- Jafari Ozumchelouei, E., Hamidian, A. H., Zhang, Y., & Yang, M. (2020). Physicochemical properties of antibiotics: A review with an emphasis on detection in the aquatic environment. *Water Environment Research*, 92(2), 177–188. <https://doi.org/10.1002/wer.1237>
- James, G. A., Beaudette, L., & Costerton, J. W. (1995). Interspecies bacterial interactions in biofilms. *Journal of Industrial Microbiology*, 15(4), 257–262. <https://doi.org/10.1007/BF01569978>
- Jennings, L. K., Storek, K. M., Ledvina, H. E., Coulon, C., Marmont, L. S., Sadovskaya, I., Secor, P. R., Tseng, B. S., Scian, M., Filloux, A., Wozniak, D. J., Howell, P. L., & Parsek, M. R. (2015). Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(36), 11353–11358. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503058112>
- Jewell, M. P., Saccomano, S. C., David, A. A., Harris, J. K., Zemanick, E. T., & Cash, K. J. (2020). Nanodiagnosics to monitor biofilm oxygen metabolism for antibiotic susceptibility testing. *Analyst*, 145(11), 3996–4003. <https://doi.org/10.1039/d0an00479k>
- Ji, Y., Shi, Y., Wang, L., Lu, J., Ferronato, C., & Chovelon, J.-M. M. (2017). Sulfate radical-based oxidation of antibiotics sulfamethazine, sulfapyridine, sulfadiazine, sulfadimethoxine, and sulfachloropyridazine: Formation of SO₂-extrusion products and effects of natural organic matter. *Science of The Total Environment*, 593–594, 704–712. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.192>
- Juhasz, P., Costello, C. E., & Biemann, K. (1993). Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry with 2-(4-hydroxyphenylazo)benzoic acid matrix. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 4(5), 399–409. [https://doi.org/10.1016/1044-0305\(93\)85005-I](https://doi.org/10.1016/1044-0305(93)85005-I)
- Juo, C. G., Chen, C. L., Lin, S. T., Fu, S. H., Chen, Y. T., Chang, Y. S., & Yu, J. S. (2014). Mass accuracy improvement of reversed-phase liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry based urinary metabolomic analysis by post-run calibration using sodium formate cluster ions. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 28(16), 1813–1820. <https://doi.org/10.1002/rcm.6962>
- Kadner, R. J., & Rogers, K. (2023). *Bacteria*. letzter Zugriff am 05.08.2023. <https://www.britannica.com/science/bacteria>
- Kalan, L., Perry, J., Koteva, K., Thaker, M., & Wright, G. (2013). Glycopeptide sulfation evades resistance. *Journal of Bacteriology*, 195(1), 167–171. <https://doi.org/10.1128/JB.01617-12>
- Kalkut, G. (1998). Sulfonamides and trimethoprim. *Cancer Investigation*, 16(8), 612–615. <https://doi.org/10.3109/07357909809032892>
- Kamphues, J., Böhm, R., Flachowsky, G., Lahrssen-Wiederholt, M., Meyer, U., & Schenkel, H. (2007). Empfehlungen zur Beurteilung der hygienischen Qualität von Tränkwasser für Lebensmittel liefernde Tiere unter Berücksichtigung der gegebenen rechtlichen Rahmenbedingungen. *Landbauforschung Völkenrode*, 3(57), 255–272.
- Kaplan, J. B. (2011). Antibiotic-induced biofilm formation. *International Journal of Artificial Organs*, 34(9), 737–751. <https://doi.org/10.5301/ijao.5000027>
- Kavita, K., Mishra, A., & Jha, B. (2011). Isolation and physico-chemical characterisation of extracellular polymeric substances produced by the marine bacterium *Vibrio parahaemolyticus*. *Biofouling*, 27(3),

- 309–317. <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.562605>
- Kemper, N. (2008). Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators*, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2007.06.002>
- Keßler, D. N., Fokuhl, V. K., Petri, M. S., & Spielmeier, A. (2019). Abiotic transformation products of tetracycline and chlortetracycline in salt solutions and manure. *Chemosphere*, 224, 487–493. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.169>
- Kietzmann, M., Meißner, J., Kemper, N., Schulz, J., Hamscher, G., Hahne, F., Kwade, A., Finke, J. H., Heiermann, G., Kolodziej, F., & Gerlings, H. (2019). *Abschlussbericht zum DBU-Verbundprojekt: Minimierung des Umwelteintrages von Tierarzneimitteln und antibiotikaresistenten Mikroorganismen durch neue Technologien Inhaltsverzeichnis*. https://www.dbu.de/OPAC/ab/DBU-Abschlussbericht-AZ-32732_01-Hauptbericht.pdf
- Kim, Dong-Hyan, Kim, B., Kim, H. S., Sohng, I. S., & Kobashi, K. (1994). Sulfation of parabens and tyrosylpeptides by bacterial arylsulfate sulfotransferases. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 17(10), 1326–1328. <https://doi.org/10.1248/bpb.17.1326>
- Kim, Dong-Hyun, Yoon, H.-K., Koizumi, M., & Kobashi, K. (1992). Sulfation of phenolic antibiotics by sulfotransferase obtained from a human intestinal bacterium. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 40(4), 1056–1057. <https://doi.org/10.1248/cpb.40.1056>
- Kim, W., Tengra, F. K., Young, Z., Shong, J., Marchand, N., Chan, H. K., Pangule, R. C., Parra, M., Dordick, J. S., Plawsky, J. L., & Collins, C. H. (2013). Spaceflight promotes biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE*, 8(4), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062437>
- Kim, Y.-H., Cha, C.-J. J., & Cerniglia, C. E. (2002). Purification and characterization of an erythromycin esterase from an erythromycin-resistant *Pseudomonas* sp. *FEMS Microbiology Letters*, 210(2), 239–244. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11187.x>
- Kim, Y. W., Sung, C., Lee, S., Kim, K. J., Yang, Y. H., Kim, B. G., Lee, Y. K., Ryu, H. W., & Kim, Y. G. (2015). MALDI-MS-based quantitative analysis for ketone containing homoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Analytical Chemistry*, 87(2), 858–863. <https://doi.org/10.1021/ac5039362>
- Klabunde-Negatsch, A., Siller, P., Sander, S., & Heberer, T. (2023). Abgabemengenerfassung von Antibiotika in Deutschland 2022. *Deutsches Tierärzteblatt*, 71(11), 1406.
- Knothe, H. (1977). A review of the medical considerations of the use of tylosin and other macrolide antibiotics as additives in animal feeds. *Infection*, 5(3), 183–187. <https://doi.org/10.1007/BF01639755>
- Köhler, T., Kok, M., Michea-Hamzehpour, M., Plesiat, P., Gotoh, N., Nishino, T., Curty, L. K., & Pechere, J. C. (1996). Multidrug efflux in intrinsic resistance to trimethoprim and sulfamethoxazole in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(10), 2288–2290. <https://doi.org/10.1063/1.3607989>
- Kono, M., O'Hara, K., & Ebisu, T. (1992). Purification and characterization of macrolide 2'-phosphotransferase type II from a strain of *Escherichia coli* highly resistant to macrolide antibiotics. *FEMS Microbiology Letters*, 97(1–2), 89–94. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(92\)90369-Y](https://doi.org/10.1016/0378-1097(92)90369-Y)
- Kromidas, S. (2011). *Validierung in der Analytik* (2. Auflage). Wiley-VCH Verlag. Weinheim, Germany.
- Kumari, A., Mankotia, S., Chaubey, B., Luthra, M., & Singh, R. (2018). Role of biofilm morphology, matrix content and surface hydrophobicity in the biofilm-forming capacity of various *Candida* species. *Journal of Medical Microbiology*, 67(6), 889–892. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000747>
- Kumari, M. K., Rama, P., Kasthuri, J. K., & Hari, B. (2014). Development and validation of RP-HPLC method for the simultaneous estimation of sulfadiazine and trimethoprim in pharmaceutical formulations.

American Journal of PharmTech Research, 4(4).

- Lamshöft, M., Sukul, P., Zühlke, S., & Spiteller, M. (2007). Metabolism of ¹⁴C-labelled and non-labelled sulfadiazine after administration to pigs. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388(8), 1733–1745. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1368-y>
- Lamshöft, M., Sukul, P., Zühlke, S., & Spiteller, M. (2010). Behaviour of ¹⁴C-sulfadiazine and ¹⁴C-difloxacin during manure storage. *Science of the Total Environment*, 408(7), 1563–1568. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.12.010>
- Lanni, E. J., Masyuko, R. N., Driscoll, C. M., Aerts, J. T., ShROUT, J. D., Bohn, P. W., & Sweedler, J. V. (2014). MALDI-guided SIMS: Multiscale imaging of metabolites in bacterial biofilms. *Analytical Chemistry*, 86(18), 9139–9145. <https://doi.org/10.1021/ac5020222>
- Lazarova, V. (1995). Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. *Water Research*, 29(10), 2227–2245. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(95\)00054-0](https://doi.org/10.1016/0043-1354(95)00054-0)
- Leipert, J., Treitz, C., Leippe, M., & Tholey, A. (2017). Identification and quantification of N-acyl homoserine lactones involved in bacterial communication by small-scale synthesis of internal standards and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 28(12), 2538–2547. <https://doi.org/10.1007/s13361-017-1777-x>
- Lewandowski, Z., & Boltz, J. P. (2011). Biofilms in water and wastewater treatment. In P. Wilderer (Ed.), *Treatise on Water Science* (pp. 529–570). Elsevier. Oxford. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53199-5.00095-6>
- Leyva-Díaz, J. C., Martín-Pascual, J., & Poyatos, J. M. (2017). Moving bed biofilm reactor to treat wastewater. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 14(4), 881–910. <https://doi.org/10.1007/s13762-016-1169-y>
- Li, H., Balan, P., & Vertes, A. (2016). Molecular imaging of growth, metabolism, and antibiotic inhibition in bacterial colonies by laser ablation electrospray ionization mass spectrometry. *Angewandte Chemie International Edition*, 55(48), 15035–15039. <https://doi.org/10.1002/anie.201607751>
- Li, J., Zhao, L., Feng, M., Huang, C. H., & Sun, P. (2021). Abiotic transformation and ecotoxicity change of sulfonamide antibiotics in environmental and water treatment processes: A critical review. *Water Research*, 202(April), 117463. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117463>
- Li, X., Wu, B., Chen, H., Nan, K., Jin, Y., Sun, L., & Wang, B. (2018). Recent developments in smart antibacterial surfaces to inhibit biofilm formation and bacterial infections. *Journal of Materials Chemistry B*, 6(26), 4274–4292. <https://doi.org/10.1039/C8TB01245H>
- Lin, Q., de Waal, T., Van Schepdael, A., & Adams, E. (2019). A mass spectrometer-compatible liquid chromatographic method for the analysis of tylosin and its impurities using a superficially porous particle column. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 165, 147–154. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.12.003>
- Linget, C., Azadi, P., MacLeod, J. K., Dell, A., & Abdallah, M. A. (1992). Bacterial siderophores: The structures of the pyoverdins of *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525. *Tetrahedron Letters*, 33(13), 1737–1740. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)91719-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)91719-2)
- Loftin, K. A., Adams, C. D., Meyer, M. T., & Surampalli, R. (2008). Effects of ionic strength, temperature, and pH on degradation of selected antibiotics. *Journal of Environmental Quality*, 37(2), 378–386. <https://doi.org/10.2134/jeq2007.0230>
- Loke, M. L., Ingerslev, F., Halling-Sørensen, B., & Tjørnelund, J. (2000). Stability of tylosin A in manure containing test systems determined by high performance liquid chromatography. *Chemosphere*, 40(7), 759–765. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00450-6](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00450-6)

- Loos, M., Gerber, C., Corona, F., Hollender, J., & Singer, H. (2015). Accelerated isotope fine structure calculation using pruned transition trees. *Analytical Chemistry*, 87(11), 5738–5744. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00941>
- Löscher, W., Richter, A., & Potschka, H. (Eds.). (2014). *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren* (9. Auflage). Georg Thieme Verlag, Stuttgart. <https://doi.org/10.1055/b-003-117816>
- Lu, Y., Jiang, M., Wang, C., Wang, Y., & Yang, W. (2014). Impact of molecular size on two antibiotics adsorption by porous resins. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 45(3), 955–961. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2013.09.009>
- Lucida, H., Parkin, J. E., & Sunderland, V. B. (2000). Kinetic study of the reaction of sulfamethoxazole and glucose under acidic conditions. *International Journal of Pharmaceutics*, 202(1–2), 47–62. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(00\)00413-0](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(00)00413-0)
- Luo, X., Zheng, Z., Greaves, J., Cooper, W. J., & Song, W. (2012). Trimethoprim: Kinetic and mechanistic considerations in photochemical environmental fate and AOP treatment. *Water Research*, 46(4), 1327–1336. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.12.052>
- Lutz, L., Pereira, D. C., Paiva, R. M., Zavascki, A. P., & Barth, A. L. (2012). Macrolides decrease the minimal inhibitory concentration of anti-pseudomonal agents against *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients in biofilm. *BMC Microbiology*, 12(1), 196. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-196>
- Maes, S., Vackier, T., Nguyen Huu, S., Heyndrickx, M., Steenackers, H., Sampers, I., Raes, K., Verplaetse, A., & De Reu, K. (2019). Occurrence and characterisation of biofilms in drinking water systems of broiler houses. *BMC Microbiology*, 19(1), 77. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1451-5>
- Maharjan, P., Huff, G., Zhang, W., & Watkins, S. (2017). Effects of chlorine and hydrogen peroxide sanitation in low bacterial content water on biofilm formation model of poultry brooding house waterlines. *Poultry Science*, 96(7), 2145–2150. <https://doi.org/10.3382/ps/pex009>
- Majewsky, M., Glauner, T., & Horn, H. (2015). Systematic suspect screening and identification of sulfonamide antibiotic transformation products in the aquatic environment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(19), 5707–5717. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8748-5>
- Malojčić, G., Owen, R. L., Grimshaw, J. P. A., Brozzo, M. S., Dreher-Teo, H., & Glockshuber, R. (2008). A structural and biochemical basis for PAPS-independent sulfuryl transfer by aryl sulfotransferase from uropathogenic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(49), 19217–19222. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806997105>
- Maloof, K. A., Reinders, A. N., & Tucker, K. R. (2020). Applications of mass spectrometry imaging in the environmental sciences. *Current Opinion in Environmental Science and Health*, 18, 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2020.07.005>
- Manzo, R. H., & de Bertorello, M. M. (1978). Isoxazoles. 4. Hydrolysis of sulfonamide isoxazole derivatives in concentrated sulfuric acid solutions. A new treatment of the medium effects on protonation equilibria and reaction rates. *The Journal of Organic Chemistry*, 43(6), 1173–1177. <https://doi.org/10.1021/jo00400a032>
- Marshall, V. P., Cialdella, J. I., Baczynskyj, L., Liggett, W. F., & Johnson, R. A. (1989). Microbial O-phosphorylation of macrolide antibiotics. *The Journal of Antibiotics*, 42(1), 132–134. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2921218>
- Martin, K. J., & Nerenberg, R. (2012). The membrane biofilm reactor (MBfR) for water and wastewater treatment: Principles, applications, and recent developments. *Bioresource Technology*, 122, 83–94. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.110>
- Masák, J., Čejková, A., Schreiberová, O., & Řezanka, T. (2014). *Pseudomonas* biofilms: Possibilities of their

- control. *FEMS Microbiology Ecology*, 89(1), 1–14. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12344>
- Matsuoka, M., Inoue, M., Endo, Y., & Nakajima, Y. (2003). Characteristic expression of three genes, *msr(A)*, *mph(C)* and *erm(Y)*, that confer resistance to macrolide antibiotics on *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, 220(2), 287–293. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00134-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00134-4)
- McFarland, J. W., Berger, C. M., Froshauer, S. A., Hayashi, S. F., Hecker, S. J., Jaynes, B. H., Jefson, M. R., Kamicker, B. J., Lipinski, C. A., Lundy, K. M., Reese, C. P., & Vu, C. B. (1997). Quantitative structure-activity relationships among macrolide antibacterial agents: In vitro and in vivo potency against *Pasteurella multocida*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 40(9), 1340–1346. <https://doi.org/10.1021/jm960436i>
- Mechesso, A. F., Yixian, Q., & Park, S.-C. (2019). Methyl gallate and tylosin synergistically reduce the membrane integrity and intracellular survival of *Salmonella Typhimurium*. *PLOS ONE*, 14(9), e0221386. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221386>
- Meißner, J. (2016). *Persönliche Mitteilung*. Hannover, Germany.
- Meng, L., Liu, H., Lan, T., Dong, L., Hu, H., Zhao, S., Zhang, Y., Zheng, N., & Wang, J. (2020). Antibiotic resistance patterns of *Pseudomonas* spp. isolated from raw milk revealed by whole genome sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01005>
- Meyer, J. M., Gruffaz, C., Raharinosy, V., Bezverbnaya, I., Schäfer, M., & Budzikiewicz, H. (2008). Siderotyping of fluorescent *Pseudomonas*: Molecular mass determination by mass spectrometry as a powerful pyoverdine siderotyping method. *BioMetals*, 21(3), 259–271. <https://doi.org/10.1007/s10534-007-9115-6>
- Mirani, Z. A., Fatima, A., Urooj, S., Aziz, M., Khan, M. N., & Abbas, T. (2018). Relationship of cell surface hydrophobicity with biofilm formation and growth rate: A study on *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 21(7), 760–769. <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2018.28525.6917>
- Mishra, R., Panda, A. K., De Mandal, S., Shakeel, M., Bisht, S. S., & Khan, J. (2020). Natural anti-biofilm agents: Strategies to control biofilm-forming pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 11(October). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.566325>
- Mohring, S. A. I., Strzysch, I., Fernandes, M. R., Kiffmeyer, T. K., Tuerk, J., & Hamscher, G. (2009). Degradation and elimination of various sulfonamides during anaerobic fermentation: A promising step on the way to sustainable pharmacy? *Environmental Science and Technology*, 43(7), 2569–2574. <https://doi.org/10.1021/es802042d>
- Mokosch, A. S., Gerbig, S., Grevelding, C. G., Haerberlein, S., & Spengler, B. (2021). High-resolution AP-SMALDI MSI as a tool for drug imaging in *Schistosoma mansoni*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 413(10), 2755–2766. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03230-w>
- Morisaki, N., Hashimoto, Y., Furihata, K., Yazawa, K., Tamura, M., & Mikami, Y. (2001). Glycosylative inactivation of chalconycin and tylosin by a clinically isolated *Nocardia asteroides* strain. *Journal of Antibiotics*, 54(2), 157–165. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.54.157>
- Nadal Jimenez, P., Koch, G., Thompson, J. A., Xavier, K. B., Cool, R. H., & Quax, W. J. (2012). The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(1), 46–65. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05007-11>
- Nadeem, S. F., Gohar, U. F., Tahir, S. F., Mukhtar, H., Pornpukdeewattana, S., Nukthamna, P., Moula Ali, A. M., Bavissetty, S. C. B., & Massa, S. (2020). Antimicrobial resistance: More than 70 years of war between humans and bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 46(5), 578–599. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1813687>

- Nakajima, Y. (1999). Mechanisms of bacterial resistance to macrolide antibiotics. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 5(2), 61–74. <https://doi.org/10.1007/s101560050011>
- Nakamura, A., Miyakozawa, I., Nakazawa, K., O'Hara, K., & Sawai, T. (2000). Detection and characterization of a macrolide 2'-phosphotransferase from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(11), 3241–3242. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.11.3241-3242.2000>
- Nozal Nalda, M. J., Bernal Yagüe, J. L., Gómez, M. T. M., Jiménez Sevilla, J. J., Bernal del Nozal, J., & Higes Pascual, M. (2006). Trace analysis of antibacterial tylosin A, B, C and D in honey by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 29(3), 405–413. <https://doi.org/10.1002/jssc.200500423>
- O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*, 54(1), 49–79. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.49>
- Oberoi, A. S., Jia, Y., Zhang, H., Khanal, S. K., & Lu, H. (2019). Insights into the fate and removal of antibiotics in engineered biological treatment systems: A critical review. *Environmental Science & Technology*, 53(13), 7234–7264. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b01131>
- Ødegaard, H. (1999). The moving bed biofilm reactor. *Water Environmental Engineering and Reuse of Water*, 0575314, 250–305.
- Ødegaard, H., Rusten, B., & Westrum, T. (1994). A new moving bed biofilm reactor - applications and results. *Water Science and Technology*, 29(10–11), 157–165. <https://doi.org/10.2166/wst.1994.0757>
- Oder, M., Arlič, M., Bohinc, K., & Fink, R. (2018). *Escherichia coli* biofilm formation and dispersion under hydrodynamic conditions on metal surfaces. *International Journal of Environmental Health Research*, 28(1), 55–63. <https://doi.org/10.1080/09603123.2017.1415309>
- OECD. (2004). Test No. 111: Hydrolysis as a function of pH. In *Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1*. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264069701-en>
- Okamoto, R., Fukumoto, T., Nomura, H., Kiyoshima, K., Nakamura, K., Takamatsu, A., Naganawa, H., Takeuchi, T., & Umezawa, H. (1980). Physico-chemical properties of new acyl derivatives of tylosin produced by microbial transformation. *The Journal of Antibiotics*, 33(11), 1300–1308. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.33.1300>
- Okumura, F., Ueda, O., Kitainura, S., & Tatuml, K. (1995). N-acetylation and N-formylation of carcinogenic arylamines and related compounds in dogs. *Carcinogenesis*, 16(1), 71–76. <https://doi.org/10.1093/carcin/16.1.71>
- Olsen, I. (2015). Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 34(5), 877–886. <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2323-z>
- Olson, M. E., Ceri, H., Morck, D. W., Buret, A. G., & Read, R. R. (2002). Biofilm bacteria: Formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 66(2), 86–92. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2008.08.001>
- Omura, S., & Nakagawa, A. (1975). Chemical and biological studies on 16-membered macrolide antibiotics. *The Journal of Antibiotics*, 28(6), 401–433. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.28.401>
- Ooi, G. T. H., Escola Casas, M., Andersen, H. R., & Bester, K. (2017). Transformation products of clindamycin in moving bed biofilm reactor (MBBR). *Water Research*, 113, 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.058>
- Paesen, J., Cypers, W., Pauwels, K., Roets, E., & Hoogmartens, J. (1995). Study of the stability of tylosin A in aqueous solutions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 13(9), 1153–1159.

[https://doi.org/10.1016/0731-7085\(95\)01522-M](https://doi.org/10.1016/0731-7085(95)01522-M)

- Palmer, A., Phapale, P., Chernyavsky, I., Lavigne, R., Fay, D., Tarasov, A., Kovalev, V., Fuchser, J., Nikolenko, S., Pineau, C., Becker, M., & Alexandrov, T. (2017). FDR-controlled metabolite annotation for high-resolution imaging mass spectrometry. *Nature Methods*, 14(1), 57–60. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4072>
- Paluch, E., Rewak-Soroczyńska, J., Jędrusik, I., Mazurkiewicz, E., & Jermakow, K. (2020). Prevention of biofilm formation by quorum quenching. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(5), 1871–1881. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10349-w>
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J., & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*, 37(1), 177–192. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>
- Papenfort, K., & Bassler, B. L. (2016). Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 576–588. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.89>
- Parker, A. E., & Hamilton, M. A. (2011). *KSA-SM-10— Assessing resemblance, repeatability, and reproducibility for quantitative methods*. Knowledge Sharing Articles; Center for Biofilm Engineering at Montana State University, Bozeman, MT. https://biofilm.montana.edu/documents/KSA-SM-10_rev012312.pdf
- Parkin, J. E., Ilett, K. F., & Joyce, D. A. (1997). Reaction of sulphamethoxazole in Bactrim DS® with carbohydrates to form glucosylamines in vitro and in vivo. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 5(6), 347–353. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(97\)00059-6](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(97)00059-6)
- Paschke, C., Leisner, A., Hester, A., Maass, K., Guenther, S., Bouschen, W., & Spengler, B. (2013). Mirion - A software package for automatic processing of mass spectrometric images. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 24(8), 1296–1306. <https://doi.org/10.1007/s13361-013-0667-0>
- Passos da Silva, D., Matwichuk, M. L., Townsend, D. O., Reichhardt, C., Lamba, D., Wozniak, D. J., & Parsek, M. R. (2019). The *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB binds to the exopolysaccharide Psl and stabilizes the biofilm matrix. *Nature Communications*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10201-4>
- Paulson, G. D., Feil, V. J., Giddings, J. M., & Lamoureux, C. H. (1992). Lactose conjugation of sulphonamide drugs in the lactating dairy cow. *Xenobiotica*, 22(8), 925–939. <https://doi.org/10.3109/00498259209049899>
- Penna, V. T. C., Martins, S. A. M., & Mazzola, P. G. (2002). Identification of bacteria in drinking and purified water during the monitoring of a typical water purification system. *BMC Public Health*, 2(1), 13. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-2-13>
- Periša, M., Babić, S., Škorić, I., Frömel, T., & Knepper, T. P. (2013). Photodegradation of sulfonamides and their N4-acetylated metabolites in water by simulated sunlight irradiation: Kinetics and identification of photoproducts. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(12), 8934–8946. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1836-1>
- Phelan, V. V., Fang, J., & Dorrestein, P. C. (2015). Mass spectrometry analysis of *Pseudomonas aeruginosa* treated with azithromycin. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 26(6), 873–877. <https://doi.org/10.1007/s13361-015-1101-6>
- Plakunov, V. K., Mart'yanov, S. V., Teteneva, N. A., & Zhurina, M. V. (2017). Controlling of microbial biofilms formation: anti- And probiofilm agents. *Microbiology*, 86(4), 423–438. <https://doi.org/10.1134/S0026261717040129>
- Prescott, J. F. (2013). Sulfonamides, diaminopyrimidines, and their combinations. In S. Giguère, J. F.

- Prescott, & P. M. Dowling (Eds.), *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine* (5. Auflage). Wiley. Hoboken, NJ. <https://doi.org/10.1002/9781118675014.ch17>
- Puckowski, A., Mioduszevska, K., Łukaszewicz, P., Borecka, M., Caban, M., Maszkowska, J., & Stepnowski, P. (2016). Bioaccumulation and analytics of pharmaceutical residues in the environment: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 127, 232–255. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.02.049>
- Radionova, A., Filippov, I., & Derrick, P. J. (2016). In pursuit of resolution in time-of-flight mass spectrometry: A historical perspective. *Mass Spectrometry Reviews*, 35(6), 738–757. <https://doi.org/10.1002/mas.21470>
- Ranieri, M. R., Whitchurch, C. B., & Burrows, L. L. (2018). Mechanisms of biofilm stimulation by subinhibitory concentrations of antimicrobials. *Current Opinion in Microbiology*, 45, 164–169. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.07.006>
- Reen, F. J., Gutiérrez-Barranquero, J. A., Parages, M. L., & O’Gara, F. (2018). Coumarin: A novel player in microbial quorum sensing and biofilm formation inhibition. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(5), 2063–2073. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8787-x>
- Reeves, D. (1982). Sulphonamides and trimethoprim. *The Lancet*, 320(8294), 370–373. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(82\)90557-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(82)90557-8)
- Reeves, D., & Wilkinson, P. J. (1979). The pharmacokinetics of trimethoprim and trimethoprim/sulphonamide combinations, including penetration into body tissues. *Infection*, 7(S4), S330–S341. <https://doi.org/10.1007/BF01639009>
- Reis, A. C., Kolvenbach, B. A., Nunes, O. C., & Corvini, P. F. X. (2020). Biodegradation of antibiotics: The new resistance determinants – part II. *New Biotechnology*, 54(August 2019), 13–27. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.08.003>
- Reker, D., Blum, S. M., Steiger, C., Anger, K. E., Sommer, J. M., Fanikos, J., & Traverso, G. (2019). “Inactive” ingredients in oral medications. *Science Translational Medicine*, 11, eaau6753. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aau6753>
- Rekker, R. F., Laak, A. M. T., & Mannhold, R. (1993). On the reliability of calculated Log P-values: Rekker, Hansch/Leo and Suzuki approach. *Quantitative Structure-Activity Relationships*, 12(2), 152–157. <https://doi.org/10.1002/qsar.19930120207>
- Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(3), 482–501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>
- Reynolds, T. B., & Fink, G. R. (2001). Bakers’ yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science*, 291(5505), 878–881. <https://doi.org/10.1126/science.291.5505.878>
- Richter, A., Hafez, H. M., Böttner, A., Gangl, A., Hartmann, K., Kaske, M., Kehrenberg, C., Kietzmann, M., Klarmann, D., Klein, G., Luhofer, G., Schulz, B., Schwarz, S., Sigge, C., Waldmann, K. H., Wallmann, J., & Werckenthin, C. (2009). Verabreichung von Antibiotika in Geflügelbeständen. *Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Grosstiere - Nutztiere*, 37(5), 321–329. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1623825>
- Righetti, L., Bhandari, D. R., Rolli, E., Tortorella, S., Bruni, R., Dall’Asta, C., & Spengler, B. (2021). Mycotoxin Uptake in Wheat — Eavesdropping Fusarium Presence for Priming Plant Defenses or a Trojan Horse to Weaken Them? *Frontiers in Plant Science*, 12(July), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.711389>
- Røder, H. L., Sørensen, S. J., & Burmølle, M. (2016). Studying bacterial multispecies biofilms: Where to start? *Trends in Microbiology*, 24(6), 503–513. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.02.019>
- Rodis, N., Tsapadikou, V. K., Potsios, C., & Xaplanteri, P. (2020). Resistance mechanisms in bacterial biofilm

- formations : A review. *Journal of Emergency and Internal Medicine*, 4(2:30), 1–8.
<https://doi.org/10.36648/2576-3938.100030>
- Rodríguez-Rodríguez, C. E., Jesús García-Galán, M., Blánquez, P., Díaz-Cruz, M. S., Barceló, D., Caminal, G., & Vicent, T. (2012). Continuous degradation of a mixture of sulfonamides by *Trametes versicolor* and identification of metabolites from sulfapyridine and sulfathiazole. *Journal of Hazardous Materials*, 213–214, 347–354. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.02.008>
- Rolfe, M. D., Rice, C. J., Lucchini, S., Pin, C., Thompson, A., Cameron, A. D. S., Alston, M., Stringer, M. F., Betts, R. P., Baranyi, J., Peck, M. W., & Hinton, J. C. D. (2012). Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation. *Journal of Bacteriology*, 194(3), 686–701. <https://doi.org/10.1128/JB.06112-11>
- Römpp, A., & Spengler, B. (2013). Mass spectrometry imaging with high resolution in mass and space. *Histochemistry and Cell Biology*, 139(6), 759–783. <https://doi.org/10.1007/s00418-013-1097-6>
- Röpke, W. (2013). *Der HPLC-Schrauber*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim, Germany.
<https://doi.org/10.1002/9783527676927>
- Rosenberg, M., & Kjelleberg, S. (1986). Hydrophobic interactions: Role in bacterial adhesion. In K. C. Marshall (Ed.), *Advances in Microbial Ecology* (Vol. 9, pp. 353–393). Springer. Boston, MA.
https://doi.org/10.1007/978-1-4757-0611-6_8
- Rowe, R. C., Sheskey, P. J., & Owen, S. C. (2006). Handbook of pharmaceutical excipients. In Royal Pharmaceutical Society of Great Britain (Ed.), *AusIMM Bulletin* (5. Auflage). Pharmaceutical Press and the American Pharmacists Association. London, UK.
- Ruhal, R., & Kataria, R. (2021). Biofilm patterns in gram-positive and gram-negative bacteria. *Microbiological Research*, 251(March), 126829. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126829>
- Rusch, M., Kauschat, A., Spielmeyer, A., Römpp, A., Hausmann, H., Zorn, H., & Hamscher, G. (2015). Biotransformation of the antibiotic danofloxacin by *Xylaria longipes* leads to an efficient reduction of its antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(31), 6897–6904.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02343>
- Sakurai, H., & Ishimitsu, T. (1980). Microionization constants of sulphonamides. *Talanta*, 27(3), 293–298.
[https://doi.org/10.1016/0039-9140\(80\)80061-0](https://doi.org/10.1016/0039-9140(80)80061-0)
- Sander, S., Klabunde-Negatsch, A., Hofmann, K., Daher, R., & Heberer, T. (2022). Abgabemengenerfassung von Antibiotika in Deutschland 2021. *Deutsches Tierärzteblatt*, 70(10), 1316.
<https://www.deutsches-tieraerzteblatt.de/artikel/abgabemengenerfassung-von-antibiotika-in-deutschland-2019.html>
- Sanganyado, E., & Gwenzi, W. (2019). Antibiotic resistance in drinking water systems: Occurrence, removal, and human health risks. *Science of The Total Environment*, 669, 785–797.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.162>
- Santos, T., Théron, L., Chambon, C., Viala, D., Centeno, D., Esbelin, J., & Hébraud, M. (2018). MALDI mass spectrometry imaging and in situ microproteomics of *Listeria monocytogenes* biofilms. *Journal of Proteomics*, 187(July), 152–160. <https://doi.org/10.1016/j.jpro.2018.07.012>
- Scales, B. S., Dickson, R. P., Lipuma, J. J., & Huffnagle, G. B. (2014). Microbiology, genomics, and clinical significance of the *Pseudomonas fluorescens* species complex, an unappreciated colonizer of humans. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 927–948. <https://doi.org/10.1128/CMR.00044-14>
- Schnurr, P. J., & Allen, D. G. (2015). Factors affecting algae biofilm growth and lipid production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 52, 418–429.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.090>

- Schulz, J., Spindler, B., Verspohl, J., Sudendey, C., & Kemper, N. (2014). Tränkwasserqualität in Nutztierhaltungen: Welche Probleme gibt es und wie entstehen sie? *Der Praktische Tierarzt*, 95(7), 649–651.
- Schwarz, S., & Chaslus-Dancla, E. (2001). Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Veterinary Research*, 32(3–4), 201–225. <https://doi.org/10.1051/vetres:2001120>
- Schwarz, S., Kehrenberg, C., & Walsh, T. R. (2001). Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17(6), 431–437. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(01\)00297-7](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(01)00297-7)
- Schwering, M., Song, J., Louie, M., Turner, R. J., & Ceri, H. (2013). Multi-species biofilms defined from drinking water microorganisms provide increased protection against chlorine disinfection. *Biofouling*, 29(8), 917–928. <https://doi.org/10.1080/08927014.2013.816298>
- Senta, I., Kostanjevecki, P., Krizman-Matasic, I., Terzic, S., & Ahel, M. (2019). Occurrence and behavior of macrolide antibiotics in municipal wastewater treatment: Possible importance of metabolites, synthesis byproducts, and transformation products [Research-article]. *Environmental Science and Technology*, 53(13), 7463–7472. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b01420>
- Sharma, G., Sharma, S., Sharma, P., Chandola, D., Dang, S., Gupta, S., & Gabrani, R. (2016). Escherichia coli biofilm: Development and therapeutic strategies. *Journal of Applied Microbiology*, 121(2), 309–319. <https://doi.org/10.1111/jam.13078>
- Sheth, H. B., Stiles, M. E., Sporns, P., Yaylayan, V. A., & Low, N. H. (1990). Reaction of reducing sugars with sulfathiazole and importance of this reaction to sulfonamide residue analysis using chromatographic, colorimetric, microbiological, or ELISA methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(4), 1125–1130. <https://doi.org/10.1021/jf00094a047>
- Simões, M., Pereira, M. O., & Vieira, M. J. (2003). Monitoring the effects of biocide treatment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms formed under different flow regimes. *Water Science and Technology*, 47(5), 217–223. <https://doi.org/10.2166/wst.2003.0325>
- Sirtori, C., Agüera, A., Gernjak, W., & Malato, S. (2010). Effect of water-matrix composition on Trimethoprim solar photodegradation kinetics and pathways. *Water Research*, 44(9), 2735–2744. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.02.006>
- Sittig, S., Kasteel, R., Groeneweg, J., Hofmann, D., Thiele, B., Köppchen, S., & Vereecken, H. (2014). Dynamics of transformation of the veterinary antibiotic sulfadiazine in two soils. *Chemosphere*, 95, 470–477. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.09.100>
- Sköld, O. (2000). Sulfonamide resistance: Mechanisms and trends. *Drug Resistance Updates*, 3(3), 155–160. <https://doi.org/10.1054/drup.2000.0146>
- Spengler, B., & Hubert, M. (2002). Scanning microprobe matrix-assisted laser desorption ionization (SMALDI) mass spectrometry: Instrumentation for sub-micrometer resolved LDI and MALDI surface analysis. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 13(6), 735–748. [https://doi.org/10.1016/S1044-0305\(02\)00376-8](https://doi.org/10.1016/S1044-0305(02)00376-8)
- Spielmeyer, A., Höper, H., & Hamscher, G. (2017). Long-term monitoring of sulfonamide leaching from manure amended soil into groundwater. *Chemosphere*, 177, 232–238. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.03.020>
- Spielmeyer, A., Petri, M. S., Höper, H., & Hamscher, G. (2020). Long-term monitoring of sulfonamides and tetracyclines in manure amended soils and leachate samples - A follow-up study. *Heliyon*, 6(8). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04656>
- Srinivasan, P., Sarmah, A. K., Manley-Harris, M., & Wilkins, A. L. (2012). Development of an HPLC method to analyze four veterinary antibiotics in soils and aqueous media and validation through fate studies.

- Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 47(13), 2120–2132. <https://doi.org/10.1080/10934529.2012.696005>
- Stedel, R. (2014). *Chemie der Nichtmetalle: Synthesen - Strukturen - Bindung - Verwendung* (4. Auflage). De Gruyter. Berlin, Boston. <https://doi.org/10.1515/9783110307979>
- Stevenson, K., McVey, A. F., Clark, I. B. N., Swain, P. S., & Pilizota, T. (2016). General calibration of microbial growth in microplate readers. *Scientific Reports*, 6(1), 38828. <https://doi.org/10.1038/srep38828>
- Stewart, P. S. (2015). Antimicrobial Tolerance in Biofilms. *Microbiology Spectrum*, 3(3), 1–13. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0010-2014>
- Stober, H., & DeWitte, W. (1982). Sulfadiazine. In K. Florey (Ed.), *Analytical profiles of drug substances* (Vol. 11). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0099-5428\(08\)60274-9](https://doi.org/10.1016/S0099-5428(08)60274-9)
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*, 56(1), 187–209. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160705>
- Suerbaum, S., Hornef, M., & Karch, H. (2020). Enterobakterien. In S. Suerbaum, G. Burchard, S. H. E. Kaufmann, & T. F. Schulz (Eds.), *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-61385-6_29
- Sukul, P., Lamshöft, M., Zühlke, S., & Spiteller, M. (2008a). Sorption and desorption of sulfadiazine in soil and soil-manure systems. *Chemosphere*, 73(8), 1344–1350. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.06.066>
- Sukul, P., Lamshöft, M., Zühlke, S., & Spiteller, M. (2008b). Photolysis of ¹⁴C-sulfadiazine in water and manure. *Chemosphere*, 71(4), 717–725. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.10.045>
- Sukul, P., & Spiteller, M. (2006). Sulfonamides in the environment as veterinary drugs. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 187, 67–101. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1280-5_2
- Susniak, K., Krysa, M., Gieroba, B., Komaniecka, I., & Sroka-Bartnicka, A. (2020). Recent developments in MALDI MSI application in plant tissue analysis. *Acta Biochimica Polonica*, 67(3), 277–281. https://doi.org/10.18388/abp.2020_5394
- Tačić, A., Nikolić, V., Nikolić, L., & Savić, I. (2017). Antimicrobial sulfonamide drugs. *Advanced Technologies*, 6(1), 58–71. <https://doi.org/10.5937/savteh1701058T>
- TAMG. (2021). *Tierarzneimittelgesetz vom 27. September 2021 (BGBl. I S. 4530), das durch Artikel 1 des Gesetzes vom 21. Dezember 2022 (BGBl. I S. 2852) geändert worden ist.*
- Tan, C. H., Lee, K. W. K., Burmølle, M., Kjelleberg, S., & Rice, S. A. (2017). All together now: experimental multispecies biofilm model systems. *Environmental Microbiology*, 19(1), 42–53. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13594>
- Tang, K., Ooi, G. T. H., Litty, K., Sundmark, K., Kaarsholm, K. M. S., Sund, C., Kragelund, C., Christensson, M., Bester, K., & Andersen, H. R. (2017). Removal of pharmaceuticals in conventionally treated wastewater by a polishing moving bed biofilm reactor (MBBR) with intermittent feeding. *Bioresource Technology*, 236, 77–86. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.159>
- Tella, A. C., & Obaleye, J. A. (2010). Metal–chelator therapy: Stability constants of transition metal complexes of pyrimidine and sulphonamide drugs. *Int. J. Chem. Sci*, 8(3), 1675–1683.
- Tentscher, P. R., Eustis, S. N., McNeill, K., & Arey, J. S. (2013). Aqueous oxidation of sulfonamide antibiotics: Aromatic nucleophilic substitution of an aniline radical cation. *Chemistry - A European Journal*,

- 19(34), 11216–11223. <https://doi.org/10.1002/chem.201204005>
- Terzic, S., Senta, I., Matosic, M., & Ahel, M. (2011). Identification of biotransformation products of macrolide and fluoroquinolone antimicrobials in membrane bioreactor treatment by ultrahigh-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(1), 353–363. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5060-x>
- Thiele-Bruhn, S., & Aust, M. O. (2004). Effects of pig slurry on the sorption of sulfonamide antibiotics in soil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 47(1), 31–39. <https://doi.org/10.1007/s00244-003-3120-8>
- Tseng, B. S., Zhang, W., Harrison, J. J., Quach, T. P., Song, J. L., Penterman, J., Singh, P. K., Chopp, D. L., Packman, A. I., & Parsek, M. R. (2013). The extracellular matrix protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by limiting the penetration of tobramycin. *Environmental Microbiology*, 15, 2865–2878. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12155>
- Turnipseed, S. B., Storey, J. M., Clark, S. B., & Miller, K. E. (2011). Analysis of veterinary drugs and metabolites in milk using quadrupole time-of-flight liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(14), 7569–7581. <https://doi.org/10.1021/jf103808t>
- Ucal, Y., Durer, Z. A., Atak, H., Kadioglu, E., Sahin, B., Coskun, A., Baykal, A. T., & Ozpinar, A. (2017). Clinical applications of MALDI imaging technologies in cancer and neurodegenerative diseases. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1865(7), 795–816. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.01.005>
- Vaara, M. (1993). Outer membrane permeability barrier to azithromycin, clarithromycin, and roxithromycin in gram-negative enteric bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(2), 354–356. <https://doi.org/10.1128/AAC.37.2.354>
- van den Bogaard, A., & Stobberingh, E. E. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics: Links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 14(4), 327–335. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(00\)00145-X](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(00)00145-X)
- Van Houdt, R., & Michiels, C. W. (2005). Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Research in Microbiology*, 156(5–6), 626–633. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.02.005>
- Van Lanen, S. G. (2013). A sulfonate relay revealed. *Nature Chemical Biology*, 9(10), 602–603. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1319>
- Vermeulen, B., De Backer, P., & Remon, J. P. (2002). Drug administration to poultry. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(6), 795–803. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00069-8](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00069-8)
- VO (EU) 2019/6. (2019). Verordnung (EU) 2019/6 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 11. Dezember 2018 über Tierarzneimittel und zur Aufhebung der Richtlinie 2001/82/EG, zuletzt geändert am 28.01.2022. *Amtsblatt Der Europäischen Union*. <http://data.europa.eu/eli/reg/2019/6/oj>
- VO (EU) Nr. 37/2010. (2010). Verordnung (EU) Nr. 37/2010 der Kommission vom 22. Dezember 2009 über pharmakologisch wirksame Stoffe und ihre Einstufung hinsichtlich der Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs, zuletzt geändert am 11.06.2023. *Amtsblatt Der Europäischen Union*. [http://data.europa.eu/eli/reg/2010/37\(1\)](http://data.europa.eu/eli/reg/2010/37(1))
- Wallmann, J., Bode, C., Köper, L., & Heberer, T. (2020). Abgabemengenerfassung von Antibiotika in Deutschland 2019. *Deutsches Tierärzteblatt*, 68(9), 1102–1109. <https://www.deutsches-tieraerzteblatt.de/artikel/abgabemengenerfassung-von-antibiotika-in-deutschland-2019.html>
- Wallmann, J., Reimer, I., Römer, A., Bender, A., & Heberer, T. (2013). Abgabemengenerfassung antimikrobiell wirksamer Stoffe in Deutschland 2011. *Deutsches Tierärzteblatt*, 9, 1230.

- Walters, M. C., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M. J., & Stewart, P. S. (2003). Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(1), 317–323. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.1.317-323.2003>
- Wang, H., Hu, C., Shen, Y., Shi, B., Zhao, D., & Xing, X. (2019). Response of microorganisms in biofilm to sulfadiazine and ciprofloxacin in drinking water distribution systems. *Chemosphere*, 218, 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.106>
- Wang, L., Li, Y., Wang, L., Zhu, M., Zhu, X., Qian, C., & Li, W. (2018). Responses of biofilm microorganisms from moving bed biofilm reactor to antibiotics exposure: Protective role of extracellular polymeric substances. *Bioresource Technology*, 254, 268–277. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.063>
- Wang, S., Yang, Y., Zhao, Y., Zhao, H., Bai, J., Chen, J., Zhou, Y., Wang, C., & Li, Y. (2016). Sub-MIC tylosin inhibits *Streptococcus suis* biofilm formation and results in differential protein expression. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00384>
- Waters, C. M., & Bassler, B. L. (2005). Quorum sensing: Cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21(1), 319–346. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001>
- Werner, J., Chintapalli, M., Lundeen, R. A., Wammer, K. H., Arnold, W. A., & McNeill, K. (2007). Environmental photochemistry of tylosin: Efficient, reversible photoisomerization to a less-active isomer, followed by photolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(17), 7062–7068. <https://doi.org/10.1021/jf070101h>
- WHO. (2009). *Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food, prepared by the seventieth meeting of the Joint FAO/WHO expert committee on food additives (JECFA)*. World Health Organization (WHO) Food Additives Series: 61. Genf, Schweiz. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44086>
- WHO. (2011). *Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective in Europe*. World Health Organization (WHO). Regional Office for Europe. Kopenhagen, Dänemark. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/326398>
- WHO. (2019). *Critically important antimicrobials for human medicine - Ranking of medically important antimicrobials for risk management of antimicrobial resistance due to non-human use, 6. Auflage*. World Health Organization (WHO) Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance (AGISAR). Genf, Schweiz. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/312266>
- Wiley, P. F., Baczynskyj, L., Dolak, L. A., Cialdella, J. I., & Marshall, V. P. (1987). Enzymatic phosphorylation of macrolide antibiotics. *The Journal of Antibiotics*, 40(2), 195–201. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.40.195>
- Wingender, J., & Flemming, H.-C. (2004). Contamination potential of drinking water distribution network biofilms. *Water Science and Technology*, 49(11–12), 277–286. <https://doi.org/10.2166/wst.2004.0861>
- Wingender, J., & Flemming, H.-C. (2011). Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214(6), 417–423. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.05.009>
- Wozniak, D. J., & Keyser, R. (2004). Effects of subinhibitory concentrations of macrolide antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest*, 125(2), 62S–69S. https://doi.org/10.1378/chest.125.2_suppl.62S
- Wright, G. D. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(10), 1451–1470. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.002>

- Wunder, D. B., Bosscher, V. A., Cok, R. C., & Hozalski, R. M. (2011). Sorption of antibiotics to biofilm. *Water Research*, 45(6), 2270–2280. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.11.013>
- Xi, C., Zhang, Y., Marrs, C. F., Ye, W., Simon, C., Foxman, B., & Nriagu, J. (2009). Prevalence of antibiotic resistance in drinking water treatment and distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(17), 5714–5718. <https://doi.org/10.1128/AEM.00382-09>
- Yang, J. F., He, M., Wu, T. F., Hao, A. P., Zhang, S. B., Chen, Y. D., Zhou, S. B., Zhen, L. Y., Wang, R., Yuan, Z. L., & Deng, L. (2018). Sulfadiazine oxidation by permanganate: Kinetics, mechanistic investigation and toxicity evaluation. *Chemical Engineering Journal*, 349(April), 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.05.018>
- Yang, J. Y., Phelan, V. V., Simkovsky, R., Watrous, J. D., Trial, R. M., Fleming, T. C., Wenter, R., Moore, B. S., Golden, S. S., Pogliano, K., & Dorrestein, P. C. (2012). Primer on agar-based microbial imaging mass spectrometry. *Journal of Bacteriology*, 194(22), 6023–6028. <https://doi.org/10.1128/JB.00823-12>
- Yang, Y. L., Xu, Y., Straight, P., & Dorrestein, P. C. (2009). Translating metabolic exchange with imaging mass spectrometry. *Nature Chemical Biology*, 5(12), 885–887. <https://doi.org/10.1038/nchembio.252>
- Yi, L., Dratter, J., Wang, C., Tunge, J. A., & Desaire, H. (2006). Identification of sulfation sites of metabolites and prediction of the compounds' biological effects. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386(3), 666–674. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0495-1>
- Zanetti, F., de Luca, G., Leoni, E., & Sacchetti, R. (2014). Occurrence of non-fermenting gram negative bacteria in drinking water dispensed from point-of-use microfiltration devices. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 21(1), 29–34.
- Zessel, K., Mohring, S., Hamscher, G., Kietzmann, M., & Stahl, J. (2014). Biocompatibility and antibacterial activity of photolytic products of sulfonamides. *Chemosphere*, 100, 167–174. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.11.038>
- Zhang, Z., Li, X., Ding, S., Jiang, H., Shen, J., & Xia, X. (2016). Multiresidue analysis of sulfonamides, quinolones, and tetracyclines in animal tissues by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 204, 252–262. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.142>
- Zhu, Y., Li, J. J., Reng, J., Wang, S., Zhang, R., & Wang, B. (2020). Global trends of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm research in the past two decades: A bibliometric study. *MicrobiologyOpen*, 9, e1021. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1021>
- Ziesing, S., & Fille, M. (2020). Resistenz. In Suerbaum, S., G. Burchard, S. H. E. Kaufmann, & T. F. Schulz (Eds.), *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie* (pp. 939–942). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-61385-6_92
- Zinner, S. H., & Mayer, K. H. (2015). Sulfonamides and Trimethoprim. In J. E. Bennett, R. Dolin, & M. J. Blaser (Eds.), *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* (8. Auflage). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00033-3>
- Zumstein, M. T., & Helbling, D. E. (2019). Biotransformation of antibiotics: Exploring the activity of extracellular and intracellular enzymes derived from wastewater microbial communities. *Water Research*, 155, 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.02.024>

7 Anhang

7.1 Ergebnisse aus den Modellbiofilmuntersuchungen und den Antibiotika-konfrontationsversuchen

7.1.1 Zellgehalte der Einzelbiofilmversuche

Tabelle 7.1: Einzelergebnisse für Zellgehalte von *E. coli* für die Konfrontation mit SDZ und TMP.

Zellgehalt <i>E. coli</i> [log₁₀(KbE/cm²)]	T0	mit AB	ohne AB
Versuch 1	6,00	5,83	6,15
Versuch 2	6,24	5,52	5,79
Versuch 3	5,83	5,86	6,08
Versuch 4	5,68	5,33	5,72
Mittelwert	5,94 ± 0,26	5,63 ± 0,26	5,93 ± 0,21

Tabelle 7.2: Einzelergebnisse für Zellgehalte von *P. fluorescens* für die Konfrontation mit SDZ und TMP.

Zellgehalt <i>P. fluorescens</i> [log₁₀(KbE/cm²)]	T0	Mit AB	Ohne AB
Versuch 1	6,07	6,13	6,15
Versuch 2	6,01	6,08	5,45
Versuch 3	5,48	5,40	5,62
Versuch 4	5,14	5,37	5,24
Mittelwert	5,68 ± 0,45	5,74 ± 0,42	5,61 ± 0,39

Tabelle 7.3: Einzelergebnisse für Zellgehalte von *E. coli* für die Konfrontation mit TYL A.

Zellgehalt <i>E. coli</i> [log₁₀(KbE/cm²)]	T0	mit TYL A	ohne TYL A
Versuch 1	6,11	5,21	6,34
Versuch 2	5,82	5,07	5,27
Versuch 3	5,83	5,23	6,08
Versuch 4	5,68	5,09	5,72
Mittelwert	5,86 ± 0,18	5,15 ± 0,09	5,85 ± 0,46

Tabelle 7.4: Einzelergebnisse für Zellgehalte von *P. fluorescens* für die Konfrontation mit TYL A.

Zellgehalt <i>P. fluorescens</i> [log₁₀(KbE/cm²)]	T0	mit TYL A	ohne TYL A
Versuch 1	6,22	5,59	6,91
Versuch 2	6,17	5,55	6,00
Versuch 3	5,48	4,81	5,62
Versuch 4	5,14	4,67	5,24
Mittelwert	5,75 ± 0,53	5,15 ± 0,48	5,94 ± 0,72

7.1.2 Bestimmung der Wiederfindung von SDZ und TMP in steriler Matrix

Um den Einfluss der Biofilmmatrix auf die Wiederfindung der Analyten zu überprüfen, wurden die Antibiotika zu einer sterilen Matrix dotiert, mittels HPLC-UV gemessen und bezüglich des berechneten Gehaltes im Vergleich zur gleichen zugesetzten Konzentration in einer Minimalmedium-Lösung ausgewertet. Eine acht Tage alte Biofilm-Lösung wurde steril filtriert, SDZ und TMP zugegeben und mit HPLC-UV gemessen.

Tabelle 7.5: Wiederfindungsrate von SDZ und TMP in Matrix im Vergleich zu reinem MM.

Gehalt [µg/mL]	in MM-Lösung	in Matrix-Lösung	Wiederfindung [%]
SDZ	103,8 ± 1,2	103,8 ± 0,6	100,0
TMP	111,1 ± 1,7	109,8 ± 0,8	98,9

Für SDZ konnte eine Wiederfindung von 100 % ermittelt werden (Tabelle 7.5). Bei dem Versuch für TMP ergab die Untersuchung eine Wiederfindung von 98,9 %. Dabei fiel auch die hohe Standardabweichung in der MM-Lösung auf. Die Ermittlung wurde hierbei mit einer Konzentration von 110 µg/mL für TMP durchgeführt. Die üblicherweise verwendete Konzentration für die Biofilmversuche ist 30 µg/mL und somit geringer als die hier untersuchte.

Die in diesem Versuch verwendete Biofilm-Lösung liegt in der sich bildenden Matrix erst am Ende des Versuches vor. Zur ersten Probenahme nach der Konfrontation sind in der Lösung nur MM und die Wirkstoffe enthalten. Die Biofilmmatrix bildet sich erst während des Versuchszeitraums durch den Biofilm aus, weshalb ein Einfluss auf die UV-Absorption der Wirkstoffe anfangs nicht durch die Biofilmmatrix möglich ist. Somit kann festgehalten werden, dass der Einfluss von steriler Biofilmlösung für SDZ und TMP gering ist und für die Berechnung der HPLC-UV-Ergebnisse vernachlässigbar ist.

7.2 MALDI-MS-Ergebnisse

7.2.1 Erste Testdurchführungen

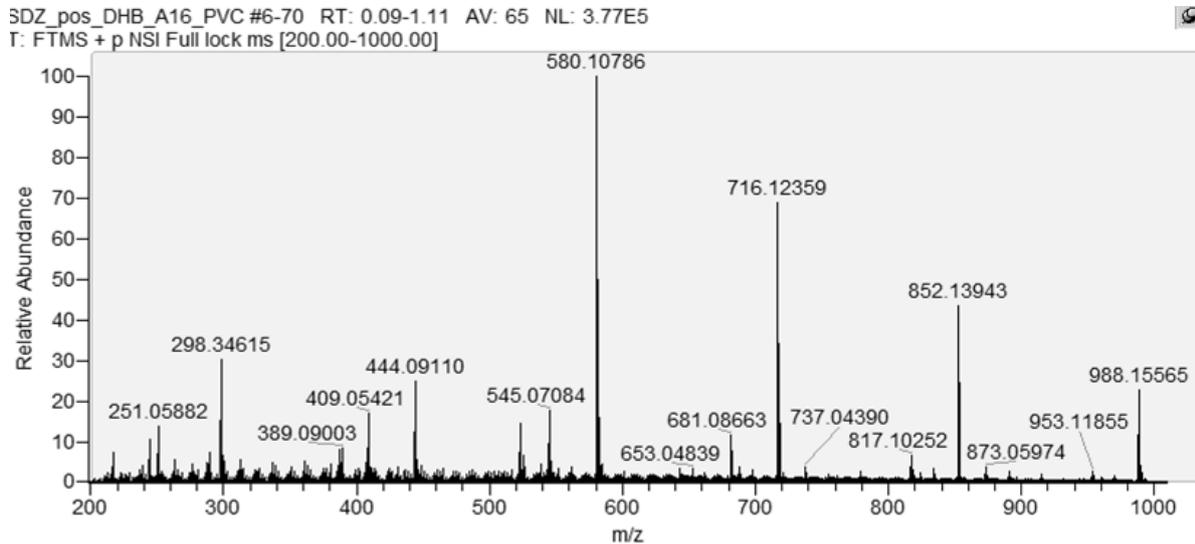


Abbildung 7.1: Massenspektren des Ionisierungstests mit DHB von SDZ (m/z -Verhältnis von 251,05882) auf einem PVC-Coupon.

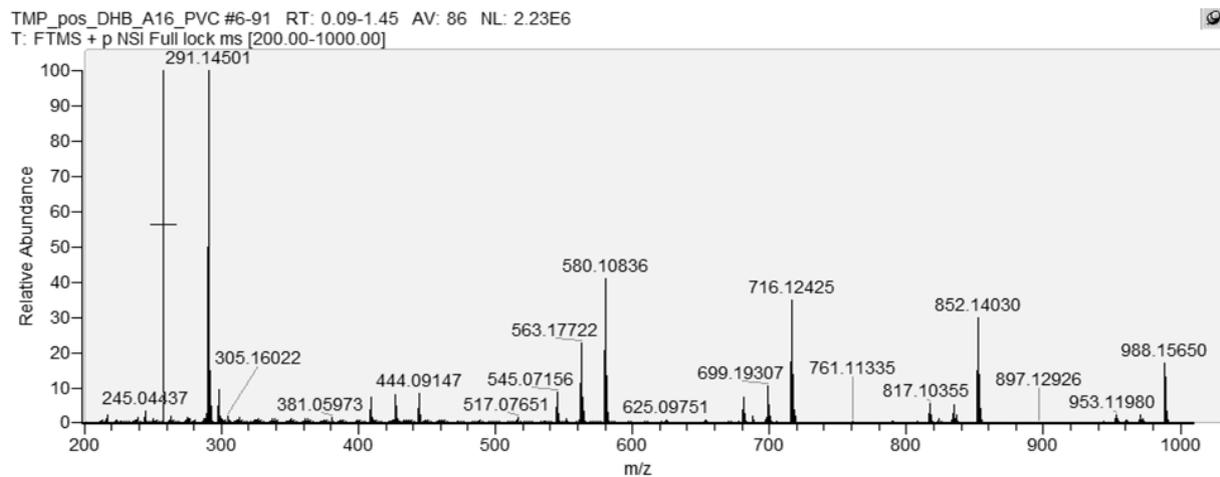


Abbildung 7.2: Massenspektren des Ionisierungstests mit DHB von TMP (m/z -Verhältnis von 291,14501) auf einem PVC-Coupon.

TYL_pos_DHB_A16_PVC #10-88 RT: 0.15-1.40 AV: 79 NL: 2.64E5
T: FTMS + p NSI Full lock ms [200.00-1000.00]

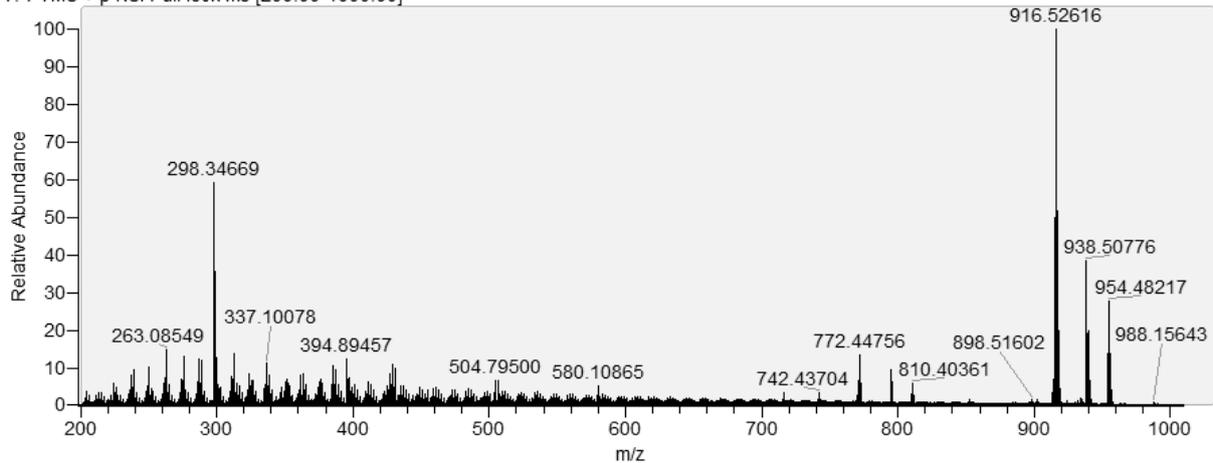


Abbildung 7.3: Massenspektren des Ionisierungstests mit DHB von TYL A (m/z -Verhältnis von 916,52616) auf einem PVC-Coupon.

7.2.2 Phospholipide – Vorschläge zu Summenformeln

Tabelle 7.6: Lipidvorschläge zu den ermittelten m/z -Verhältnissen aus Metaspac.

m/z -Verhältnis	Summenformel und Adduktion	Lipidvorschlag Metaspac*	weitere detektierte zugehörige Adduktionen
690,50677	$C_{37}H_{72}NO_8P + H^+$	PE (16:0; 16:1)**	+ Na, +K, +2Na-H***
704,52240	$C_{38}H_{74}NO_8P + H^+$	PE (16:0; 17:1)**	+ Na, +K, +2Na-H***
716,52256	$C_{39}H_{74}NO_8P + H^+$	PC (14:1(9Z)/17:1(9Z))	+ Na
718,53838	$C_{39}H_{76}NO_8P + H^+$	PC (16:0/15:1(14))	+ Na
752,52008	$C_{40}H_{76}NO_8P + Na^+$	PC (16:1(9Z)/16:1(9Z))	

* Datenbanken auf metaspac2020.eu verwendet: Lipidmaps, HMDB, Swisslipids. Monat der Verwendung: Juni 2021

** PE: Phosphatidylethanolamine PC: Phosphatidylcholine (Lecithine).

*** Vorschlag aus (H. Li *et al.*, 2016)

Tabelle 7.7: m/z -Verhältnisse von MALDI-MS-Messungen von Biofilmrohr ohne Antibiotika (X3) und Biofilmrohr mit SDZ und TMP (X2ST), die angegebenen Adduktionen, Coverage und die maximale Intensität des jeweiligen m/z -Verhältnisses; Messung durchgeführt mit Dr. Dhaka Bandhari.

Masse [m/z] Exakt	Addukt	X3		X2ST	
		Coverage [%]	Max. Intens.	Coverage [%]	Max. Intens.
690,50677	+H	75,22	3.114	99,71	22.496
712,48871	+Na	94,33	4.498	99,98	20.699
728,46246	+K	2,73	348	69,84	974
734,47066	+2Na-H	68,22	2.681	99,28	6.085
704,52240	+H	9,48	764	99,73	20.688
726,50415	+Na	28,41	2.210	100,00	20.601
742,47800	+K	0,11	117	63,32	954
748,48639	+Na	8,22	1.085	99,62	6.024
716,52256	+H	35,80	1.379	79,21	3.155
738,50455	+Na	67,94	1.949	93,27	2.853
718,53838	+H	34,96	1.480	71,44	2.526
740,52051	+Na	66,39	3.756	89,18	3.057
752,52008	+Na	7,80	571	52,50	862

7.3 HR-MS-Messungen von TP von TYL A

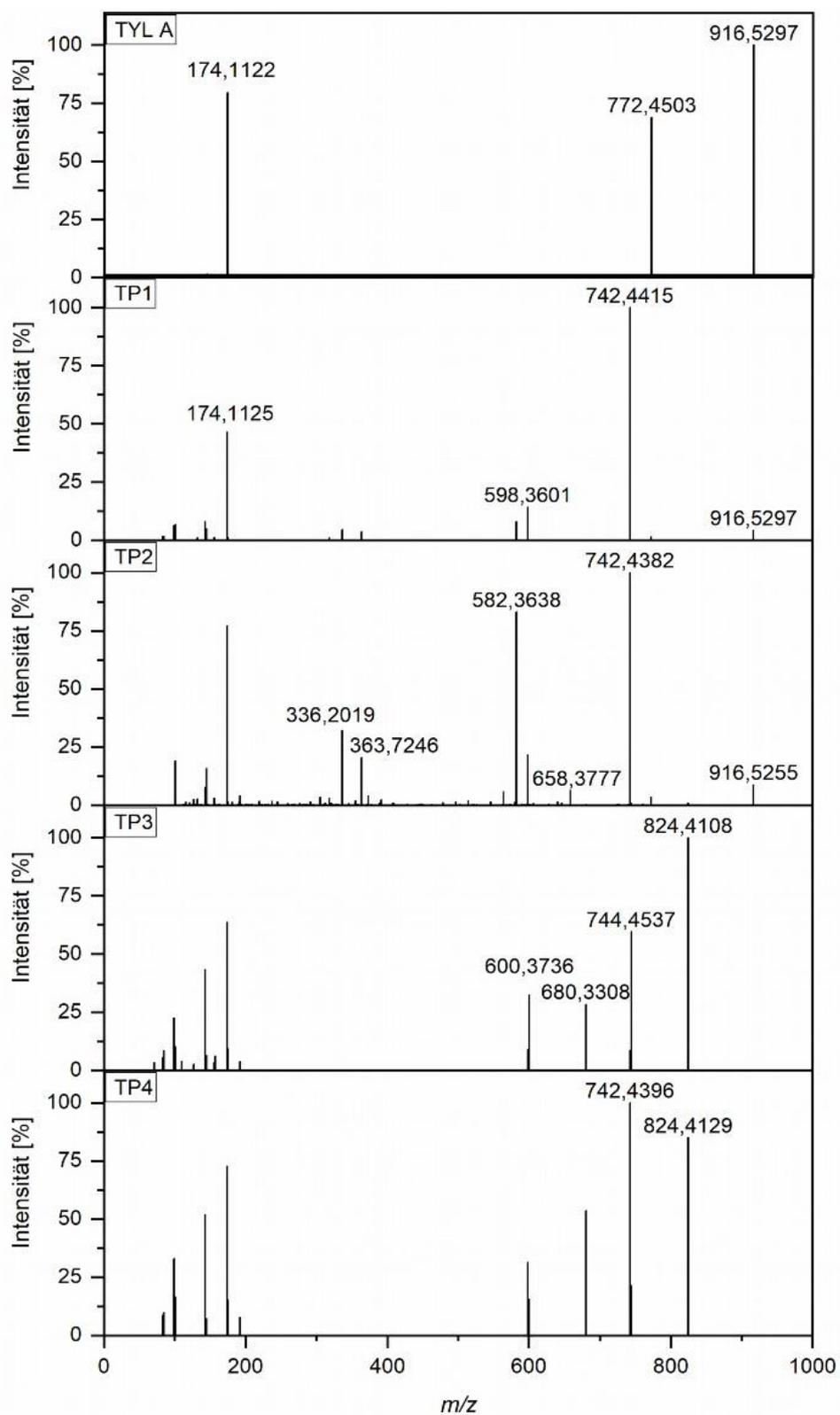


Abbildung 7.4: Fragmentierungsspektren nach ESI⁺-TOF-MS-Messungen im positiven Modus von TYL A (CE 40 V) und TP 1-4 (CE 30 V).

Im Folgenden sind die HR-MS-Messungen im negativen Modus von TYL A und der TP 1-3 aufgeführt. Diese wurden am Institut für Organische Chemie der JLU Gießen durch Dr. Raffael Wende durchgeführt.

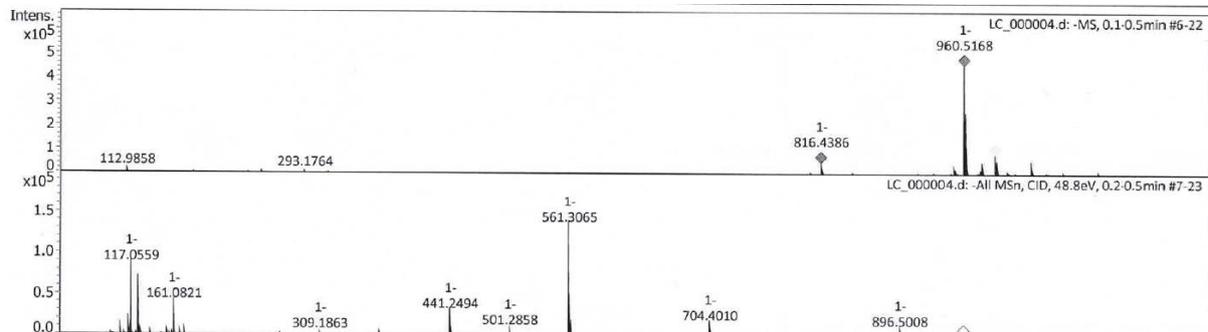


Abbildung 7.5: HR-MS-Messung von TYL A im negativen Modus; Oben: Full Scan, Unten: Fragmentierungsspektrum des m/z -Verhältnisses von 960 (CE 48,8 V).

Das m/z -Verhältnis von 960 entspricht $[M+\text{Ameisensäure-H}]^-$ von TYL A.

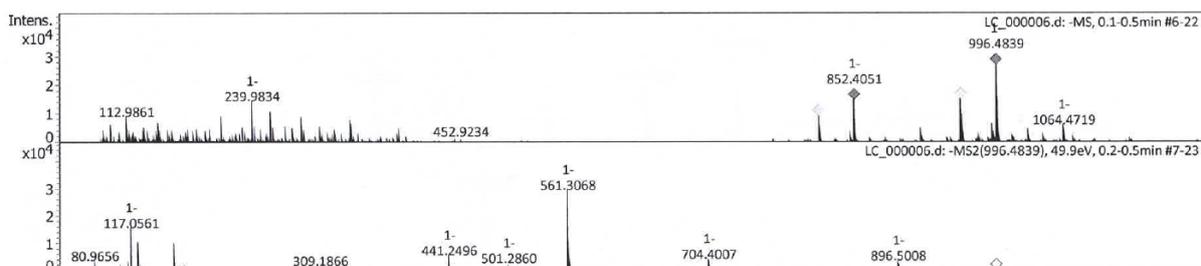


Abbildung 7.6: HR-MS-Messung von TP1 im negativen Modus; Oben: Full Scan, Unten: Fragmentierungsspektrum des m/z -Verhältnisses 996 (CE 49,9 V).

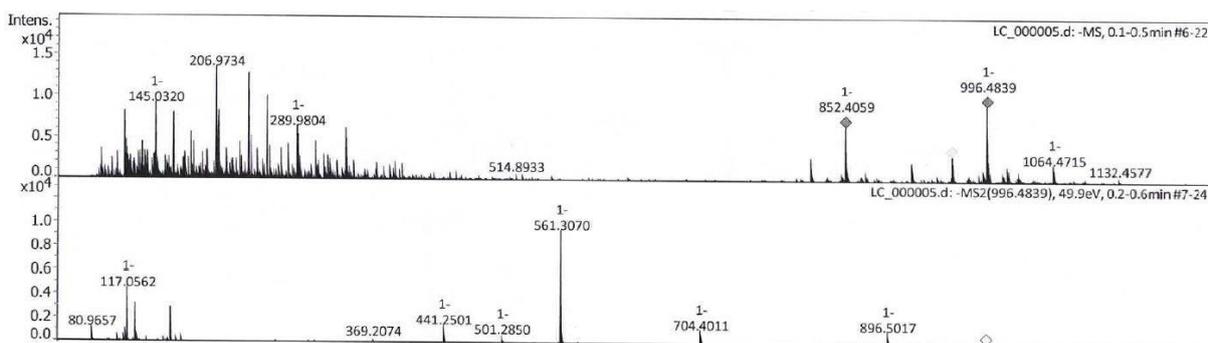


Abbildung 7.7: HR-MS-Messung von TP2 im negativen Modus; Oben: Full Scan, Unten: Fragmentierungsspektrum des m/z -Verhältnisses 996 (CE 49,9 V).

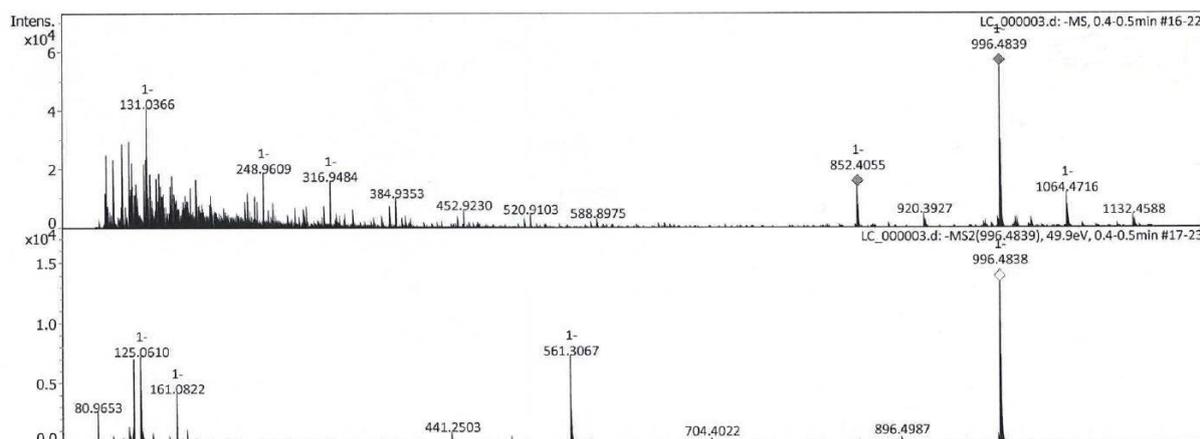


Abbildung 7.8: HR-MS-Messung von TP3 im negativen Modus; Oben: Full Scan, Unten: Fragmentierungsspektrum des m/z -Verhältnisses von 996 (CE 49,9 V).

7.4 Interaktionseinzelergebnisse von SDZ und Lactose oder Glucose

Tabelle 7.8: Glucose-Addukt-Gehalt in der Einzelwirkstoff- und der Kombinationswirkstofflösung bei pH-Werten von 2, 7 und 10 an den Versuchstagen von 0 bis 112 Tagen (4 Monate).

Versuchstag	Glucose-Addukt-Gehalt [SDZ-Flächen-%]					
	pH 2		pH 7		pH 10	
	S ¹	S+T ²	S ¹	S+T ²	S ¹	S+T ²
0	0	0,07	0	0	0	0
1	2,05	2,22	0,83	0,81	0,02	0,07
2	2,12	2,13	1,52	1,36	0,06	0,17
3	2,15	2,13	2,27	2,11	0,17	0,35
7	2,34	2,43	5,51	5,52	0,98	1,40
15	2,26	2,19	9,26	8,82	2,94	3,52
21	2,03	2,06	10,46	10,31	4,23	4,90
28	2,06	2,13	12,01	11,58	6,26	6,92
42	2,05	2,07	13,00	12,25	9,20	9,53
56	1,71	2,08	14,10	13,32	11,59	12,13
84	1,70	2,19	14,50	13,84	13,98	14,44
112	1,75	2,22	14,85	13,92	15,20	15,53

1) „S“ steht für die Einzelwirkstofflösung aus SDZ und Glucose.

2) „S+T“ steht für die Kombinationswirkstofflösung aus SDZ und TMP mit Glucose.

Tabelle 7.9: Lactose-Addukt-Gehalt in der Einzelwirkstoff- und der Kombinationswirkstofflösung bei pH-Werten von 2, 7 und 10 an den Versuchstagen von 0 bis 112 Tagen (4 Monate).

Versuchstag	Lactose-Addukt-Gehalt [SDZ-Flächen-%]					
	pH 2		pH 7		pH 10	
	S ¹	S+T ²	S ¹	S+T ²	S ¹	S+T ²
0	0,02	0	0,01	0	0	0
1	2,26	2,38	1,08	1,06	0,05	0,11
2	2,11	2,3	1,24	1,89	0,13	0,25
3	2,27	2,24	2,87	2,58	0,37	0,46
7	2,49	2,57	6,47	6,43	1,69	1,57
15	2,26	2,25	10,32	9,59	4,36	3,45
21	2,07	2,09	11,38	11,09	5,76	4,93
28	2,04	2,25	12,68	12,69	7,78	7,48
42	2,13	2,18	13,68	13,43	11,17	10,54
56	2,25	2,31	15,10	14,20	13,50	13,18
84	2,10	2,26	14,80	13,56	14,82	14,22
112	1,95	2,44	14,35	13,87	15,98	15,48

1) „S“ steht für die Einzelwirkstofflösung aus SDZ und Lactose.

2) „S+T“ steht für die Kombinationswirkstofflösung aus SDZ und TMP mit Lactose.

Veröffentlichungen

Originalarbeiten

HAHNE, F., JENSCH, S., HAMSCHER, G., MEIßNER, J., KIETZMANN, M., KEMPER, N., SCHULZ, J., MATEUS-VARGAS, R. H. (2022): Innovative Perspectives on Biofilm Interactions in Poultry Drinking Water Systems and Veterinary Antibiotics Used Worldwide. *Antibiotics*, 11 (1), 77.

HAHNE, F., MÜLLER, C., YALMAN, S., MEIßNER, J., KIETZMANN, M., HAMSCHER, G. (2023): Stability of Important Veterinary Antibiotics Amoxicillin, Sulfadiazine, and Trimethoprim in Practice-Relevant Model Solutions. *Antibiotics*, 12 (2), 214.

Projektbericht

Abschlussbericht zum DBU-Verbundprojekt (2019): Minimierung des Umwelteintrages von Tierarzneimitteln und antibiotikaresistenten Mikroorganismen durch neue Technologien. AZ: 32732/01-31.

https://www.dbu.de/OPAC/ab/DBU-Abschlussbericht-AZ-32732_01-Hauptbericht.pdf

Tagungsbeiträge

HAHNE, F., MATEUS-VARGAS, R.H., JENSCH, S., KEMPER, N., HAMSCHER, G., SCHULZ, J. (2019): Einfluss eines bakteriellen Biofilms auf verschiedene Antibiotika in einem Modell-Tränkwasserrohr. 48. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Dresden, Deutschland, 16.- 18. Sept. **(Poster)**

HAHNE, F., JENSCH, S., MATEUS-VARGAS, R.H., SCHULZ, J., HAMSCHER, G. (2019): Effects of a bacterial biofilm on various antibiotics. 17th International Conference on Production Diseases in Farm Animals. Bern, Schweiz, 27.- 29. Juni **(Vortrag)**

MATEUS-VARGAS, R.H., HAHNE, F., JENSCH, S., KEMPER, N., HAMSCHER, G., SCHULZ, J. (2019): Interaktionen zwischen bakteriellen Biofilmen und Antibiotika in Tränkwasserleitungen in der Tierhaltung – Ein Modellversuch. 4. Tagung der Fachgruppe „Umwelt- und Tierhygiene“, Stuttgart-Hohenheim, Deutschland, 16.- 17. Sept. **(Vortrag)**

HAHNE, F., MÜLLER, C., YALMAN, S., HAMSCHER, G. (2018): Stability of important veterinary antibiotics in various solutions. 8th International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis, Gent, Belgien, 22.- 25. Mai **(Poster)**

HAHNE, F., MÜLLER, C., YALMAN, S., HAMSCHER, G. (2018): Stabilität von wichtigen Veterinärantibiotika in verschiedenen Lösungen. Regionalverbandstagung Südwest der LChG, Gießen, Deutschland, 06.- 07. März **(Poster)**

Danksagung

Mit großer Freude und Dankbarkeit blicke ich auf die Fertigstellung meiner Dissertation zurück. Dieser Weg war geprägt von Herausforderungen, Entdeckungen und erkenntnisreichen Momenten, die ohne die Unterstützung und Zusammenarbeit vieler Personen nicht möglich gewesen wären.

Ein besonderer Dank gebührt Herrn Professor Dr. Hamscher, der mir das spannende und vielseitige Thema dieser Arbeit anvertraut hat und die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Arbeitskreis durchführen zu können. Seine fachlichen Ratschläge und seine Unterstützung haben maßgeblich dazu beigetragen, dass diese Arbeit entstehen konnte.

Ebenso möchte ich mich herzlich bei Frau Professorin Dr. Hamann bedanken, die das Zweitgutachten meiner Dissertation übernommen hat, sowie bei Professor Dr. Spengler und Professorin Dr. Schnell für den Beitritt zur Prüfungskommission.

Ein großer Dank gilt Professor Dr. Spengler zusätzlich und seinem Team für die wertvolle Unterstützung bei der Durchführung der MALDI-MS-Messungen. Ihre Fachkenntnisse und technische Expertise waren entscheidend für die präzise Analyse meiner Proben. Besonders bedanke ich mich bei Dr. Dhaka Bandhari, Domenic Dreisbach und vor allem Dr. Stefanie Gerbig für die konstruktiven Besprechungen, das Korrekturlesen und die Darstellungstipps.

Die Deutsche Bundesstiftung Umwelt (DBU) verdient besondere Anerkennung für die finanzielle Förderung des Projektes „Minimierung des Umwelteintrages von Tierarzneimitteln und antibiotikaresistenten Mikroorganismen durch neue Technologien“. Bei meinen DBU-Projektpartnern Professor Dr. Kietzmann, PD Dr. Jochen Schulz und Dr. Rafael Hernan Mateus-Vargas bedanke ich mich für die erfolgreiche Zusammenarbeit und die gemeinsame Weiterentwicklung und Forschung zu dem aktuellen Thema Biofilm.

Ein großer Dank gilt auch der Arbeitsgruppe Hamscher. Ich bedanke mich für das angenehme, gemeinsame Arbeiten, für das tolle Klima im Labor und Unterstützung inner- und außerhalb des Gebäudes. Vor allem gilt mein Dank Dr. habil. Astrid Spielmeier sowie Dr. Madeleine Petri, die mich immer fachlich und persönlich unterstützt haben, Rücksicht auf Maite genommen haben und ohne die der Laboralltag nicht so bunt gewesen wäre.

Ich danke auch allen Studentinnen und Studenten, die während ihrer Praktika und Abschlussarbeiten Methoden entwickelt und Daten generiert haben. Dabei sind besonders Clarissa Müller, Simon Jensch, Jannik Zielinski und Lars Neuhöfer zu erwähnen.

Daneben gilt mein Dank Dr. Raffael Wende für die fachliche Unterstützung und Messung der negativen HR-MS sowie Dr. Heike Hausmann für die Durchführung und die Ideen der besonderen NMR-Messungen (Institut für Organische Chemie, JLU Gießen).

Darüber hinaus möchte ich mich bei meinen Kolleginnen und Kollegen am Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie der Justus-Liebig-Universität Gießen bedanken – im Besonderen Dr. Florian Birk, Friederike Bürger, Julia Büttner, Dr. Martin Gand und Dr. Andreas Hammer. Ebenso möchte ich für die technische Unterstützung von Anja Platt, Bianka Daubertshäuser und Peter Seum bedanken.

Ein großes und herzliches Dankeschön geht an meine Familie und Freunde. Danke, dass ihr mich in jeglicher Situation unterstützt habt und ihr mich meinen Weg habt gehen lassen. Danke, dass ihr da wart und Zeit hattet. Ihr habt die Zeit bereichert und erleichtert.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt zu haben, die ich in der Thesis angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Thesis erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Ort, Datum

Unterschrift