

## RAVIMIJÄÄGID KESKKONNAS. FLUOROKINOLONIDE MÄÄRAMINE MULLAS JA TOIDUTAIMEDES

M. Lillenberg, M. Roasto, T. Püssa

**ABSTRACT. Drug Residues in Environment. Estimation of Fluoroquinolones in Soil and Food Plants.** All drugs approved by the authorities have undergone pharmacokinetic and animal toxicological studies. But there is still lack of knowledge about their fate and effects on the environment. After excretion, these drugs and their metabolites can contaminate the environment. Fluoroquinolones are broad spectrum synthetic antibiotics used both in human and veterinary medicine. There exists a couple of structurally very closely related fluoroquinolones – enrofloxacin and ciprofloxacin. The last one is the main metabolite of the first. Enrofloxacin with its metabolites enters the manure and further the soil. It has been shown that both fluoroquinolones are strongly adsorbed to soil and resistant to physical, chemical and microbiological attacks. The fluoroquinolones can be uptaken by plants growing in soil fertilised with manure and in such way finally reach human as well as animal food. Very small amounts of broad spectrum antibiotics in everyday food may generate the strains of resistant microorganisms in human and animal organism. There is scarce data available concerning the actual fate and effect of the drug residues in the environment and in food plants. Methods of quantitative assay of these compounds are needed.

The aim of the research was to study the uptake and accumulation of fluoroquinolones by plants cultivated in soil amended with drugs. For that purpose microbiological agar-diffusion method for estimation of content of antibiotics residues in plants and soil was put up. In the role of testorganism *Bacillus subtilis* was used. The results were controlled by chromatography (HPLC) after 10 months.

**Keywords:** contamination, environment, enrofloxacin, ciprofloxacin, residues, manure, soil, food plants, microbiological agar-diffusion method, *Bacillus subtilis*, HPLC method.

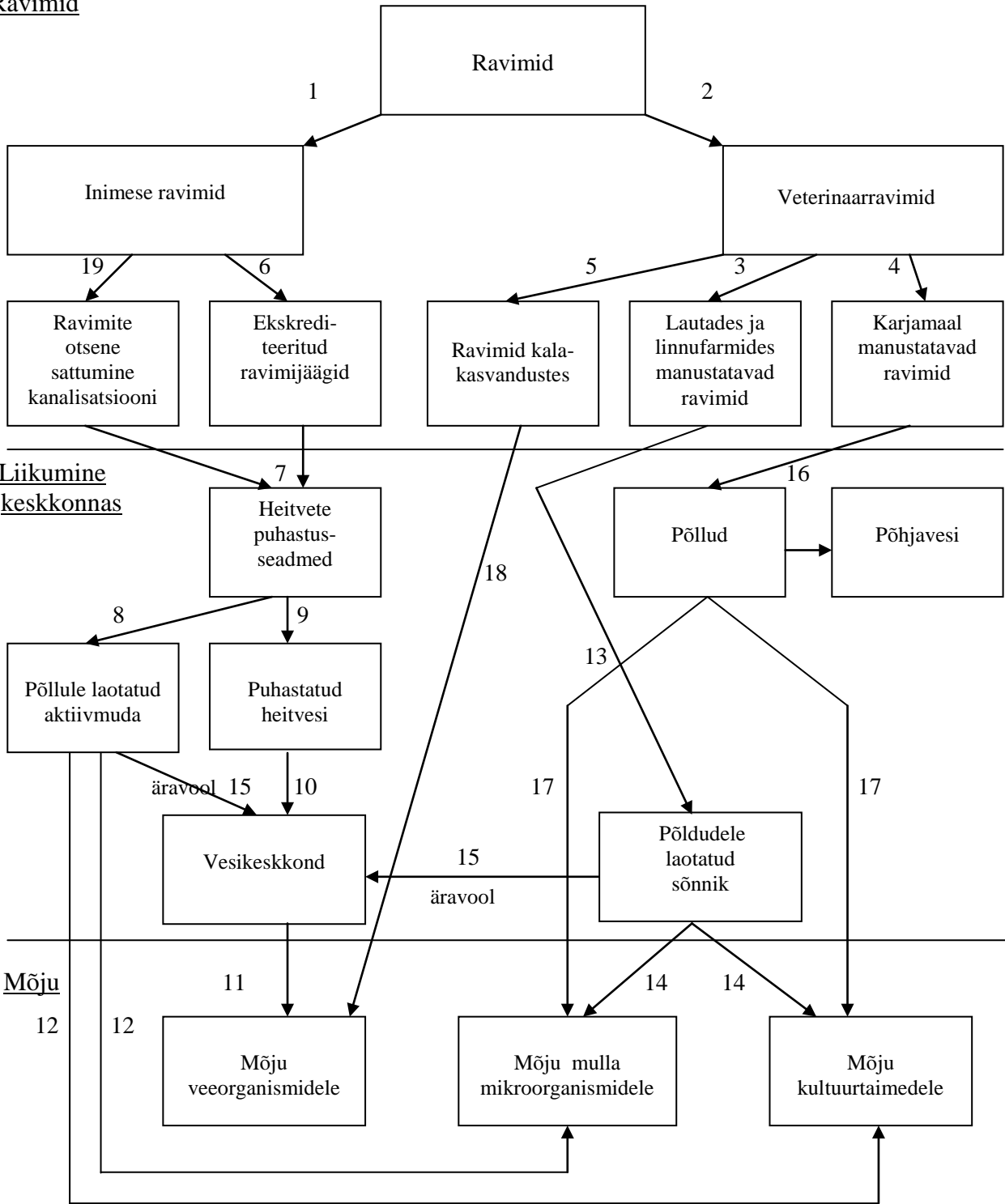
### Sissejuhatus

Tänapäeval on kõik riigi tervishoiuameti poolt lubatud ravimid läbinud põhjalikud farmakokineetilised ja loomtoksikoloogilised uuringud. Seni teatakse aga vähe ravimite edasisest saatuses pärast eksrediteerimist. Keskkonda sattunud võivad ravimid ja nende metaboliidid mõjuda kahjulikult vee ja mulla elustikule.

Fluorokinolonid on laia toimespektriga sünteetilised ravimid. Et vältida ristuva resistentsuse teket, ei kasutata üldjuhul loomade ja inimeste raviks üht ja sama antibiootikumi. Ent on olemas kaks väga lähedase struktuuriga fluorokinolooni – enrofloksatsiin ja tsiprofloksatsiin, millest esimene leiab kasutamist veterinaar- ja teine humaanmeditsiinis. Ainevahetuse lõpp-produktidena jõuavad nii enrofloksatsiin ja selle põhimetaboliit tsiprofloksatsiin ekskrementidesse. Põllumajandusloomade sõnnikut kasutatakse laialdaselt orgaanilise väetisena, sealhulgas toidutaimede kasvatamisel. On alust arvata, et teiste ravimijääkide kõrval sisaldab sõnnik ka fluorokinolonide jääke. Koos mullavees lahustunud mineraalainetega võivad taimed omastada ka vees lahustunud fluorokinolooni. Sel teel on võimalik ravimijääkide sattumine nii loomasööta kui ka inimese toidulauale. Nende pidev väikestes kogustes omastamine võiks põhjustada patogeensete mikroobide ravimresistentsust, esile kutsuda allergiaid ja kahjustada maksa. Loomne toidutoore allub rangele riiklikule kontrollile – ravimijääke kas ei tohi seal üldse olla või siis on kehtestatud nende lubatud sisalduse maksimumpiir (*MRL – maximum residue limit*). Antibiootikumide võimalikku akumulereerumist taimedesse on seni vähe uuritud. Et pole teada, millistes kogustes on taimed võimelised omastama antibiootikume, puuduvad taimse toidutoorme kohta ka vastavad piirnormid.

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida fluorokinolonide akumulereerumist mullast taimedesse ja näidata nende antibakteriaalse toime säilimist seal. Selleks töötati välja mikrobioloogiline agar-difusioon meetod fluorokinolonide määramiseks mullas ja taimedes. Testorganismina kasutati bakterit *Bacillus subtilis*. Enrofloksatsiini säilimist salatis kontrolliti 10 kuu pärast kromatograafiliselt HPLC-meetodiga.

**Võtmesõnad:** saastamine, keskkond, enrofloksatsiin, tsiprofloksatsiin, ravimijäägid, orgaaniline väetis, muld, toidutaimed, mikrobioloogiline agar-difusioon meetod, *Bacillus subtilis*, HPLC-meetod.

Ravimid**Joonis 1.** Ravimite võimalikud liikumised keskkonnas**Figure 1.** Routes of Medical Substances in the Environment (Halling-Sørensen et al., 1998)

## Kirjanduse ülevaade

### Ravimijääkide liikumine keskkonnas

Kuni viimase ajani ei pööratud ravimijääkide saatusele keskkonnas erilist tähelepanu. Põhjuseks, miks ravimid võivad keskkonda sattudes aga kahjulikeks osutada, on asjaolu, et nad on loodud eesmärgiga mõjutada bioloogilisi objekte. Neil on piisav lipofiilsus, mis võimaldab läbida biomembraane, ja stabiilsus, mis hoiab ära nende inaktiveerumise enne raviefekti tekitamist. Nii on ravimitel vajalikud omadused, et akumulieruda organismides ja kutsuda esile muutusi vee ja pinnase ökosüsteemides. Mõne enam kasutatava ravimi aastane tarbimine võib olla küllalt suur (Halling-Sørensen *et al.*, 1998). Näiteks Taanis on hinnatud antibiootikumide aastaseks summaarseks tarbimismääraks ligikaudu 34 tonni (Stuer-Lauridsen *et al.*, 2000).

Joonisel 1 on näidatud mitmesuguste ravimite võimalikud liikumisteed keskkonnas. Ravimid võib liigitada üldiselt kaheks: ühed, mida kasutatakse inimesel ravimisel (1) ja teised, mida kasutatakse loomade puhul (2). Veterinaarravimeid kasutatakse lautades ja linnufarmides kas kasvustimulaatoritena söötade koostises või teraapias (3). Kariloomi ravitakse ka otse karjamaal (4). Kalakasvandustes antakse ravimeid sööda koostises, mida puistatakse vette (5). Inimese või looma organismist väljuvad ravimid uriini ja väljaheidetega kas muundumata kujul või metaboliitidena. Inimese ekskrementidega jõuavad ravimijäägid kanalisatsioonivõrgustikku (6) ja sealt edasi heitvete puhastusseadmesse (7).

Brasiilias tehtud uurimistöö näitab, et erinevate ravimite puhul varieerub puhastusseadet muutumatuna läbinud ainehulk 12%-st kuni 90%-ni (Stumpt *et al.*, 1999). Siit järeldub, et puhastusseadmed ei kõrvalda ravimijääke täielikult. Märkimisväärne kogus neist jõuab pinnavette ja võib sealt sattuda ka joogivette. Ravimijääkide võimalik saatus võib pärast puhastusseadmesse sisenemist olla põhimõtteliselt üks järgmistest:

1) aine on kergesti degradeeritav ning juba puhastusseadmes toimub tema kiire ja täielik lagunemine süsinikdioksiidiks ja veeks;

2) aine on lipofiilne ja raskesti degradeeritav ning ta akumulieerub muutumatuna puhastusseadme aktiivmudasse (8);

3) aine metaboliseeritakse küll hüdrofiilsemaks, kuid ta ei lagune, vaid läbib puhastusseadme (9) ja jõuab vesikeskkonda (10).

Kui jõkke jõudnud metaboliit on bioloogiliselt aktiivne, võib see mõjutada veeorganisme (11). Aktiivmuda, mille koostises on ka lipofiilsed ravimijäägid, laotatakse põldudele väetiseks (12). Sel viisil satuvad ravimid pinnasesse, kus võivad mõjutada mikroorganisme ja akumulieeruda kultuurtaimedes. Loomakasvatustes kasutatavad kasvustimulaatorid ja ravimid jõuavad kas muutumatutena või metaboliitidena sõnnikusse (13). Viimane laotatakse väetisena põldudele. Nii jõuavad ka veterinaarravimid pinnasesse, kus võivad mõjutada mullaorganisme ja kultuurtaimi. Aktiivmuda või sõnnikuga põldudele sattunud hüdrofiilsete omadustega ravimijäägid võivad viimasade tagajärjel vee äravooluga jällegi pinnavette sattuda (15). Karjamaadel loomadele manustatavad ravimid läbivad looma organismi ja väljuvad ekskrementidega (16). Sel viisil tekivad pinnases lokaalselt eriti tugevad ravimijääkide kontsentratsioonid, mis avaldavad tugevat mõju mullaorganismidele ja taimedele (17). Pinnasesse jõudnud ravimid ja nende metaboliidid kas mineraliseeritakse mullaorganismide poolt või jõuavad muutumatutena põhjavette. Kalakasvandustes kasutatavad ravimid puistatakse kalatoidu koostises otse veekogudesse. Suur hulk sellisest ravitoidust jääb kalade poolt puutumata, langeb veekogu põhja ja võib mõjutada setetes ning bentoses elavaid organisme (18). Teadmata kogus humaanmeditsiinis kasutatavate ravimite ülejääkidest arvatakse sattuvat otse kanalisatsiooni (19).

### Ravimijääkide säilimine keskkonnas

Raviaine säilimisaeg keskkonnas sõltub tema molekuli ehitusest. Mulla mikroorganismid lagundavad ravimid kas nende orgaanilisteks metaboliitideks või süsihappegaasiks ja veeks. Antibiootikumide all mõistetakse üldiselt mikroobide, seente, loomsete ja taimsete organismide poolt produtseeritavaid aineid, millel on võime pidurdada teiste mikroorganismide elutegevust või nad surmata. Antibiootikumide tootmise võime on organismidel välja kujunenud pikaajalise evolutsiooni tulemusena ja see kujutab endast tähtsat tegurit olelusvõitluses (Tshervjakova, Terezova, 1986). Samas on evolutsiooni tulemusena looduses välja kujunenud ka biodegradatsiooni rajad looduslike antibiootikumide mineraliseerumiseks. Tänapäeval toodetakse ja kasutatakse aga laialdaselt ka sünteetilisi ja poolsünteetilisi antibakteriaalseid aineid, mis on loodusele “võõrad” ja raskesti lagundatavad. Seetõttu püsivad ka näiteks fluorokinoloonid keskkonnas kaua. On tõestatud fluorokinoloonide tugev seostumine sõnniku ja mullaga, mis võib olla nende aeglase degradeerumise täiendavaks põhjuseks (Marengo *et al.*, 1997). Enro- ja tsiprofloksatsiini sisaldust sõnnikus ega sõnnikuga väetatud mullas ei ole uuritud. Teatakse, et enrofloksatsiini elimineerimine

loomorganismist toimub 80% ulatuses läbi neerude ja 20% ulatuses sapi kaudu (Crumplin, 1986). Fluorokinoloonide kontsentratsioon uriinis võib ületada 100–300 korda nende kontsentratsiooni seerumis (Montay *et al.*, 1984). On alust arvata, et vedela sõnnikuga väetatud põllumajanduslik maa võib saastuda fluorokinoloonidega (Nowara *et al.*, 1997).

On püütud arvutuslikult ennustada ravimijääkide kontsentratsioone sõnnikuga väetatud mullas. Sealjuures on arvestatud metaboliitide teket, ekskretsiooni teid ja kiirust, sõnniku kogumise, hoidmise ja põllule laotamise korraldust jne. Kõik need mõjurid ei oma ennustamisel võrdset tähtsust. Lautades peetavate loomade puhul, kui sõnnikus segunevad uriin ja roe ning sõnnikut hoitakse enne põllule laotamist hoidlates, on ekskretsiooni teed ja kiirus väiksema tähtsusega. Karjamaal ravitud loomade ekskrementidega jõuavad ravimijäägid aga otse mulda. Sel juhul on nimetatud faktorid ravimijääkide kontsentratsiooni ennustamisel olulise tähtsusega. Põhiline osa ravimijääkidest jõuab mulda siiski lautadest saadud sõnnikuga. Ennustused põhinevad Taani Keskkonnakaitse Agentuuri andmetel. Sigade ja veiste sõnnik laotatakse põldudele vastavalt 150 kg N / ha ja 265 kg N / ha aastas. Arvutati, kui suur võiks ravimijääkide kontsentratsioon olla 10 cm sügavusel mullas. Väikseim ennustatav kontsentratsioon seasõnnikuga väetamisel saadi hormoonide (oksütoksiin ja vasopressiin) puhul: 0,01–0,05 µg/kg mulla kohta, suurim kontsentratsioon aga ravi eesmärgil kasutatavate antibiootikumide puhul: 1–9 µg/g. Sealhulgas arvutati enrofloksatsiini võimalikuks kontsentratsiooniks mullas 3,81 µg/g. Kasvustimulaatorite puhul saadi selliseks kontsentratsiooniks 0,2–1,3 µg/g ning seedetegevust ja ainevahetust reguleerivate ravimite puhul 0,04–5,7 µg/g.

Lehmasõnniku suurema lämmastiksisalduse tõttu olid arvutuslikud ravimijääkide kontsentratsioonid mullas lehmasõnnikuga väetamisel mõnevõrra suuremad kui seasõnniku puhul. Kesknärvisüsteemi ravimite jääke arvutati lehmasõnnikuga väetatud mullas vahemikus 0,09 µg/g (ksülosiin) kuni 28 µg/g (metamisoolnaatrium).

Näitena selle kohta, kuidas neid kontsentratsioone saada, toome enrofloksatsiini sisalduse leidmise seasõnnikuga väetatud mullas (150 kg N / ha aastas):

Looma keskmine eluskaal	100	kg
Enrofloksatsiini annustamine	10	mg/kg
Päevane doos	1	g
Sõnnikutoodang looma kohta päevas	4,8	kg
N-sisaldus päevases sõnnikus	0,03	kg
Vajalik põllupind saadud N kogusele	1,75	m <sup>2</sup>
N kontsentratsioon antud põllupinnal	0,57	g/m <sup>2</sup>
Enrofloksatsiini kontsentratsioon	3,81	µg/g

Kõik need arvutused on tehtud lähtudes halvimal võimalikust situatsioonist (ekskrementidega eraldub maksimaalne kogus ravimijääke) (Halling-Sørensen *et al.*, 2002).

Mõistatavalt on need ennustused ligikaudsed ja vajavad kinnitamist katsetega.

### Ravimijäägid taimedes

Ravimijääkide võimalikku liikumist mullast taimedesse on seni vähe uuritud. Kirjanduses on andmed sulfadimetoksiini akumulatsioonist otra. Sulfadimetoksiini sisaldus odra juurtes ja lehtedes määrati kromatograafilise (HPLC) meetodiga. Juurtes oli sulfadimetoksiini ligikaudu 4 korda rohkem kui lehtedes-vartes, vastavalt 79 ja 18 µg/g (sulfadimetoksiini sisaldus kasvumullas 100 µg/g). On tõstatatud küsimus MRL (maksimaalse lubatud sisalduse) kehtestamise vajalikkusest veterinaarravimite jääkidele taimedes (Brambilla *et al.*, 1996).

Käesolevas töös käsitletud enrofloksatsiini ja tsiprofloksatsiini summaarne MRL lihas on 100 µg/kg (Riigi..., 2000). Taimse toidutoorme korral on MRL kehtestatud vaid pestitsiidijääkidele.

Eestis on kvalitatiivse mikrobioloogilise agar-difusioonmeetodiga püütud määrata tsiprofloksatsiini ja sulfadimetoksiini akumulatsioonist aedoad, redises ja suvinisus (Aruksaar *et al.*, 1999). Tsiprofloksatsiin andis inhibitsioonitsooni ainult redises (pH 8, tsoonide läbimõõdud kasvumulla kontsentratsioonidel 50 ja 100 µg/g vastavalt 12 ja 13 mm). Kasutatud meetod ei näidanud sulfadimetoksiini akumulatsioonist üheski taimes. Ometi on kirjanduses näidatud sulfadimetoksiini akumulatsioonist rea taimede maapealsetes osades (Brambilla *et al.*, 1996; Migliore *et al.*, 1995). Et negatiivse tulemuse andis ka sulfadimetoksiiniga segatud muldade mikrobioloogiline analüüs, teevad autorid järelduse, et toodud tulemuste alusel ei saa teha otsust ravimijääkide sisalduse kohta taimedes (Aruksaar *et al.*, 1999).

Siit tuleneski vajadus töötada välja spetsiaalselt taimedele ja mullale kohandatud mikrobioloogiline meetod ravimijääkide määramiseks.

## Materjalid ja meetodid

### Taimekasvatus

Taimede kasvatamine toimus selleks kohandatud ruumis, mida õhutati ja valgustati päevavalguslampidega, imiteerimaks looduslike tingimusi. Eksperimendiks valiti 3 taime: lehtsalat (*Lactuca sativa*), oder (*Hordeum vulgare L.*) ning harilik kurk (*Cucumis sativus L.*). Taimede seemned külvati plastikpottidesse, milles oli 1 kg väetisevaba ja fluorokinoloonide lahusega segatud mulda. Kaalutud mullakogused segati eelnevalt fluorokinoloonide lahustega plastikaatkotis. 200 ml destilleeritud vees lahustati vajalik kogus enro- või tsiprofloksatsiini ja lahus lisati mullakogustele nii, et antibiootikumi lõppkontsentratsiooniks potis saadi 10, 50, 200 või 500 mg/kg. Iga kontsentratsiooni jaoks võeti kolm paralleelpotti. Kontrolliks kasvatati iga taimeliiki fluorokinoloonidevabas mullas 5 paralleelpotis.

Taimi kasteti läbi potis oleva plastiktoru, mis avanes poti põhjas. Selline kastmine oli vajalik, et vältida fluorokinoloonide uhtmist ülemistest mullakihtidest alumistesse ja säilitada potis võimalikult ühtlane kontsentratsioon. Eksperiment kestis 28 päeva, salati puhul tsiprofloksatsiini mullas 42 päeva. Seejärel taimed koristati, eraldati juured, kuivatati ja jahvatati peeneks. Mullaproovid võeti kolme paralleelpoti ülemistest kihtidest ja segati. Kontrollmuldi ja kontrolltaimi kasutati kontrolliks ja spaikimisteks (fluorokinoloonide lisamine etteantud hulga ekstraheerimissegusse), et saada kalibreerimisgraafikuid arvutusteks. Fluorokinoloonidega segatud muldi ja taimi analüüsiti mikrobioloogilisel agar-difusioonmeetodil.

### Mikrobioloogiline agar-difusioonmeetod fluorokinoloonide määramiseks mullas ja taimedes. Kromatograafiline (HPLC) meetod

Testkultuurid. *B. subtilis* BGA või ATCC 6633 eosesuspensioon.

Lahused. Trimetoprimi (TMP) vesilahus 100 µg/ml. Tsiprofloksatsiini ja enrofloksatsiini vesilahused spaikimiseks: kontsentratsioon 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 40, 80 µg/ml.

Testsööde. Testagar pH-8 (Merck) valmistatakse vastavalt tootja õpetusele ja autoklaavitakse. Kui söötme temperatuur on langenud 48 kraadini, lisatakse söötmele TMP vesilahust 100 µl 100 ml söötme kohta.

Inokulum. Söötmele lisatakse *B. subtilis*'e spoorisuspensiooni 1 ml 100 ml söötme kohta.

Testsöötme kogus. 6 ml söödet mõõdetakse steriilse pipetiga plastikust Petri tassidesse Ø 90 mm.

Spaikimine mulda. 2 g antibiootikumivaba õhkuiva kontrollmulda segatakse 10 ml fluorokinolooni lahusega 50ml-lises korgiga plastikuubis. Fluorokinoloonide lahused tehakse kontsentratsioonidega 0,5; 1; 2; 5; 10; 20; 40 ja 80 µg/ml, et saada spaikimuldades kontsentratsioonid vastavalt 2,5; 5; 10; 25; 50; 100; 200; 400 µg 1 g õhkuiva mulla kohta. Plastiktuube hoitakse 5 tunni jooksul toatemperatuuril pöörleval vertikaalsel segajal. Seejärel tsentrifuugitakse 30 min 4000 p/min. Supernatant eemaldatakse dekanteerimise teel ja sade kuivatatakse Petri tassidel üle öö. Mullad autoklaavitakse 1 at juures 30 min.

Spaikimine taimedesse. 50 mg kuivatatud ja peeneks jahvatatud antibiootikumivaba taimset materjali segatakse 2 ml-stes korgiga plastiktuubides 1 ml fluorokinolooni lahusega. Spaikimislahused valmistatakse kontsentratsioonidega 0,5; 1; 2; 5, 10 µg/ml. Plastiktuube hoitakse toatemperatuuril pöörleval vertikaalsegajal 3 tundi ja seejärel tsentrifuugitakse 10 min 4000 p/min. Supernatant eemaldatakse Pasteuri pipetiga 1 ml Eppendorfi topsidesse. Sade kuivatatakse õhu käes Petri tassil üle öö.

Proovi võtmine. Analüüsitav taimne materjal kuivatatakse ja peenestatakse. Taimset materjali kaalutakse prooviks 2,5 mg. Autoklaavitud mulda kaalutakse prooviks 5 mg.

Analüüsi käik. Petri tassides tardunud inokuleeritud testsöötmele asetatakse pintsettidega steriilne põhjata metallsilinder Ø 6 mm. Proov puistatakse silindrisse. Silinder eemaldatakse. Iga proov analüüsitakse paralleelselt kahel Petri tassil. Samal testsöötmel analüüsitakse kahe paralleelina ka kontrollproov (0) ja spaigitud proovid. Vedelike (kalibreerimislahused, spaikimise supernatandid) analüüsiks asetatakse testsöötmele steriilsete pintsettidega immutamata paberkettake Ø 6 mm. Steriilse pipetiga mõõdetakse 13,6 µl analüüsitavat vedelikku, millega immutatakse kettake.

Selline kogus on vajalik, et kettake märguks maksimaalselt ning samas ei valguks vedelik üle ketta ääre söötmesse. Petri tassid proovidega asetatakse antibiootikumi difundeerumiseks geeli 22 tunniks külmkappi +4...+6 °C juurde. Seejärel inkubeeritakse proove termostaadis temperatuuril 37 °C 18 tundi. Bakterikasvu inhibitsioonitsooni diameetrid mõõdetakse ning arvutatakse paralleelproovide keskmine väärtus.

#### Kalibreerimine muldadele.

Arvestades, et kogu spaigitud antibiootikum seostub mullaga (adsorptsioon ligi 100%), konstrueeritakse kalibreerimisgraafik teljestikus lg kalibreerimismuldade kontsentratsioonidest (x-telg) ja kalibreerimismuldade inhibitsioonitsoonide diameetrid (y-telg).

#### Kalibreerimine taimedele.

Et taimsesse materjali ei seostu kogu spaigitud antibiootikum, tehakse antud juhul kalibreerimisgraafik seostumise protsenti arvestades. Viimane arvutatakse spaikimiste supernatantide diameetrite järgi graafikult teljestikus lg spaikimislahuste kontsentratsioonist (x) ja inhibitsioonitsooni diameeter (y). Edasi arvutatakse taimega seostumise astme (%) järgi tegelik antibiootikumi kontsentratsioon spaigitud taimedes. Et leida antibiootikumi kontsentratsiooni proovis, konstrueeritakse graafik teljestikus lg antibiootikumi kontsentratsioon spaiktaimes (x) ja spaiktaimede inhibitsioonitsooni diameeter (y).

#### Arvutused.

Antibiootikumi kontsentratsioon proovis arvutatakse kalibreerimisgraafiku võrrandi järgi  $y=ax+b$ , kus a ja b on konstandid, x on lg antibiootikumi kontsentratsioonist proovis, y on proovi inhibitsioonitsooni diameeter. Antibiootikumi kontsentratsioon proovis = antilog x.

#### HPLC-meetod.

Fluorokinoloonide kromatograafiliseks määramiseks taimedes võeti aluseks L. Migliore poolt (Migliore, 2001) mõneti modifitseeritud kirjanduslik meetod (Palmada *et al.*, 2000).

## Tulemused ja arutelu

### Fluorokinoloonid mullas

Fluorokinoloonide sisalduse määramiseks katsemuldades tehti esmalt kindlaks nende seondumisaste mullaosakeste külge. Selleks tehti spaikimislahused kontsentratsioonidega 10, 20, 40, 80, 120 µg/ml ja viidi antibiootikumivabasse kontrollmulda. Mõõdeti muldade supernatantide ja spaikimislahuste inhibitsioonitsoonide diameetrid. Kalibreerimisgraafiku järgi arvutati enrofloksatsiini ja tsiprofloksatsiini kontsentratsioon supernatantides ja viimase alusel nende seondumise aste (%) mullaga. Kui spaikimismulla supernatant bakterikasvu inhibitsiooni ei andnud, siis arvestati, et kogu spaigitud antibiootikum on seondunud kontrollmullaga.

Enrofloksatsiini spaikimislahuste kontsentratsioonidel 20, 40, 80, 120 µg/ml oli enrofloksatsiini seondumine mullaga vastavalt 99,6; 99,5; 99,5; 99,4%. Kontsentratsioonil 10 µg/ml enrofloksatsiini spaikimislahuse supernatant inhibitsioonitsooni ei andnud ja seondumisastmeks loeti siin 100%. Tulemus on kooskõlas kirjanduse andmetega, kus enrofloksatsiini adsorptsioon mullale pH 5,9 juures oli 99,5%. Meie katses kasutati mulda, mille pH oli 6,0.

Tsiprofloksatsiini puhul oli mullaga seondumise aste spaikimislahuste kontsentratsioonidel 10, 20, 40, 80 ja 120 µg/ml vastavalt 100; 100; 99,9; 99,6 ja 99,5%.

Mida nõrgem oli fluorokinoloonide spaikimislahuste kontsentratsioon, seda suurem oli nende mullaga seondumise aste. Üldiselt võib öelda, et seondumisaste lähenes 100 protsendile kõigil kontsentratsioonidel. Seetõttu võeti eksperimentaalmuldade fluorokinoloonide sisalduse arvutamisel aluseks spaikmuldade kalibreerimisgraafik, arvestades, et kogu spaigitud antibiootikum oli ka mullaga seostunud.

Metoodika väljatöötamisel arvutati ka agar-difusioonmeetodi katseviiga. Selleks analüüsiti tsiprofloksatsiiniga mulda sama testsöötmeiga täidetud 10 erineval Petri tassil. Katseviiga oli seda väiksem, mida väiksem oli mulla antibiootikumisisaldus. Mulla tsiprofloksatsiini algkontsentratsioonide 500, 200, 50 ja 10 µg/g korral oli suurim hälve mõõdetud inhibitsioonitsooni diameetrite vahel vastavalt ±2; 2; 1,5 ja 1 mm. Sellest lähtudes ei saa mikrobioloogilise agar-difusioonmeetodiga määratud fluorokinoloonide sisaldused olla väga täpsed. Kontsentratsiooni täpsustamiseks on vajalik kromatograafiline analüüs.

Mullaproovid võeti taimekasvatuseksperimenti 2., 14. ja 28. päeval. Nagu selgub tabelitest 1 ja 2, fluorokinoloonide kontsentratsioon mullas katse jooksul oluliselt ei muutu. Võrreldes enrofloksatsiini sisaldusi katsemuldades 2. ja 28. päeval, selgub, et enamasti see katse lõpuks veidi tõuseb, mõnel juhul jääb samaks, kuid kontsentratsioonide erinevus jääb üldjuhul katsevea piiresse (tabel 1). Kolme päeva proovide keskmine määratud antibiootikumisisaldus võib olla suurem kui kasvumulla nominaalkontsentratsioon, ent ka see vahe jääb katsevea piiresse (tabel 3 ja 4). Tsiprofloksatsiini sisaldus katsemuldades eksperimenti lõpuks väheneb (tabel 2). Lõppjäreldusi teha oleks aga ennatlik, sest tsiprofloksatsiini sisalduse vahe eksperimenti alguses ja lõpus võetud

proovides jääb jällegi katsevea piiridesse. Võrreldes katsemuldade algkontsentratsioone eksperimendi 3 päeva keskmiste kontsentratsioonidega, võib öelda, et mulda lisatud fluorokinoloonide antimikroobne aktiivsus püsis suhteliselt muutumatuna 28 päeva jooksul (tabel 3).

Kirjanduse andmetel metaboliseerub enrofloksatsiin osaliselt tsiprofloksatsiiniks nii looma organismis (Mengozi *et al.*, 1996) kui ka mullas (Nekrassova, 2001). Oletatakse, et tsiprofloksatsiini juuresolekul enrofloksatsiini antimikroobne aktiivsus võimendub – ilmneb sünergism (Mengozi *et al.*, 1996). Et seda mikrobioloogilise agar-difusioonmeetodiga näidata, oleks ilmselt vajalik pikem katseaeg. Küll aga kinnitavad meie eksperimendi tulemused kirjanduses mainitud fluorokinoloonide stabiilsust mullas (Golet *et al.*, 2002).

**Tabel 1.** Enrofloksatsiini sisaldus mullas eksperimendi 2., 14. ja 28. päeval  
**Table 1.** Concentration of Enrofloxacin in Soil on the 2., 14. and 28. Day of the Experiment

Muld Soil	Algkonts. Initial conc., µg/g	i diameeter / <i>Inhib. zone diam.</i> (mm)			Enrofloksatsiini konts. / <i>Enrofloxacin conc.</i> (µg/g)		
		2. päev 2 <sup>nd</sup> day	14. päev 14 <sup>th</sup> day	28. päev 28 <sup>th</sup> day	2. päev 2 <sup>nd</sup> day	14. päev 14 <sup>th</sup> day	28. päev 28 <sup>th</sup> day
Oder Barley	500	41,5	41,5	42	487	487	520
	200	34,5	35	35	193	206	206
	50	24	25	25,5	48	55	59
	10	12,5	14,25	14,5	11	13	14
Salat Lettuce	500	41	42	42,5	455	520	555
	200	35	37	37	206	268	268
	50	25,25	26,25	26	57	65	63
	10	11,5	12	12	9	10	10
Kurk Cucumber	500	41,75	42	41,75	503	520	503
	200	36	35,5	36	235	220	235
	50	23,5	25	24,5	45	55	52
	10	12	12	12,5	10	10	11

\* määratud enrofloksatsiini kontsentratsioonid on ümardatud täisarvuni / *conc. of estimated enrofloxacin is rounded*

\* spaikimine ja kalibreerimine tabelis 3 / *spiking and calibration in table 3*

**Tabel 2.** Tsiprofloksatsiini sisaldus mullas eksperimendi 2., 14. ja 28. päeval  
**Table 2.** Concentration of Ciprofloxacin in Soil on the 2., 14. and 28. Day of the Experiment

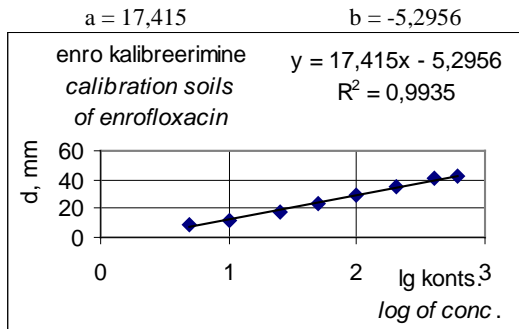
Muld Soil	Algkonts. Initial conc., µg/g	i diameeter / <i>Inhib. zone diam.</i> (mm)			Tsiprofloksatsiini konts. / <i>Ciprofloxacin conc.</i> (µg/g)		
		2. päev 2 <sup>nd</sup> day	14. päev 14 <sup>th</sup> day	28. päev 28 <sup>th</sup> day	2. päev 2 <sup>nd</sup> day	14. päev 14 <sup>th</sup> day	28. päev 28 <sup>th</sup> day
Oder Barley	500	37	36	35,75	567	494	477
	200	31,5	31	30,5	266	248	231
	50	21	21	20	62	62	54
	10	8	7,5	7,5	10	10	10
Salat Lettuce	500	36,75	36,5	36,5	548	529	529
	200	32	31,5	31	284	266	248
	50	21,75	21	20,5	69	62	58
	10	8,5	8,25	8	11	11	10
Kurk Cucumber	500	37,75	37	36,5	629	567	529
	200	31	31	30,5	248	248	231
	50	21	20	19	62	54	47
	10	8,5	8	8	11	10	10

\* määratud tsiprofloksatsiini kontsentratsioonid on ümardatud täisarvuni / *conc. of estimated ciprofloxacin is rounded*

\* spaikimine ja kalibreerimine tabelis 3 / *spiking and calibration in table 3*

**Tabel 3a.** Enro spaikmullad  
**Table 3a.** Calibration soils of enrofloxacin

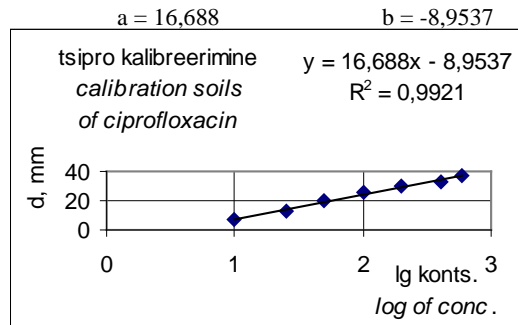
Konts. / Conc., µkg/g	Ig konts. log of conc.	i tsoon / i zone, mm
5	0,699	8,5
10	1	12
25	1,398	17,25
50	1,699	23,5
100	2	29,25
200	2,301	35,25
400	2,602	41
600	2,778	43



**Joonis 2a.** Enro kalibreerimisgraafik  
**Figure 2a.** Calibration curve of enrofloxacin

**Tabel 3b.** Tsipro spaikmullad  
**Table 3b.** Calibration soils of ciprofloxacin

Konts. / Conc., µkg/g	Ig konts. log of conc.	i tsoon / i zone, mm
5	0,699	
10	1	7,5
25	1,398	13,25
50	1,699	20
100	2	26
200	2,301	30
400	2,602	33,5
600	2,778	37



**Joonis 2b.** Tsipro kalibreerimisgraafik  
**Figure 2b.** Calibration curve of ciprofloxacin

**Tabel 4.** Fluorokinolonide sisaldus mullas. Kolmel päeval võetud proovide keskmine  
**Table 4.** Content of fluoroquinolones in soil. Average of three measurements

Muld Soil	Algkonts. Initial conc., µkg/g	Enrofloksatsiin / Enrofloxacin			Tsiprofloksatsiin / Ciprofloxacin		
		i d, mm d i, mm	Ig konts. log of conc.	konts. / conc., µkg/g	i d, mm d i, mm	Ig konts. log of conc.	konts. / conc., µkg/g
Oder Barley	500	41,7	2,698570	500	36,25	2,708754	511
	200	34,8	2,302360	201	31	2,394157	248
Salat Lettuce	50	24,8	1,728142	53	20,7	1,776947	60
	10	13,75	1,093631	12	7,7	0,997944	10
Kurk Cucumber	500	41,8	2,704312	506	36,6	2,729727	537
	200	36	2,371266	235	31,5	2,424119	266
	50	25,8	1,785564	61	21,1	1,800916	63
	10	11,8	0,981659	10	8,25	1,030902	11
	500	41,8	2,704312	506	37,1	2,759689	575
	200	35,8	2,359781	229	30,8	2,382172	241
	50	24,3	1,699431	50	20	1,735001	54
	10	12,2	1,004628	10	8,2	1,027906	11

\* i d / d i - inhibitsioonitsooni diameeter / diameter of inhibition zone

\* määratud kontsentratsioonid on ümardatud täisarvuni / conc. of estimated fluoroquinolones are rounded

### Fluorokinolonid taimedes

Fluorokinolonide sisalduse leidmiseks katsetaimedes arvestati nagu mulla puhulgi antibiootikumi seondumise astet spaikimisel. Spaikimislahused kontsentratsioonidega 0,5; 1; 2; 5 ja 10 µg/ml segati kuivatatud taimse materjaliga meetodikas kirjeldatud viisil. Fluorokinolonide seondumisaste taimse materjaliga arvatati samuti nagu nende seondumisaste mullaga. Fluorokinolonide seondumisaste (%) taimega olenes taime liigist ja spaikimislahuse kontsentratsioonist. Nagu mulla puhulgi oli fluorokinolooni seondumisaste seda kõrgem, mida madalam oli spaikimislahuse kontsentratsioon. Enrofloksatsiini seondumisaste salatiga oli olenevalt spaikimislahuse kontsentratsioonist 64–100%, odraga 28–100%, kurgiga 23–100%. Tsiprofloksatsiini seondumisaste salatiga oli



analoogselt 90–100%, odraga 64–100% ja kurgiga 70–100%. Taimega seondumise astme järgi arvatati fluorokinolooni tegelik kontsentratsioon spaiktaimes ja selle järgi koostati kalibreerimisgraafik.

Eksperimendi tulemustest nähtub, et fluorokinoloonid tõepoolest tõusevad koos mullaveega taimedesse ja akumuleeruvad seal, säilitades oma antimikroobse aktiivsuse. Sama sisalduse korral mullas oli enrofloksatsiini sisaldus katsetaimedes üldjuhul suurem kui tsiprofloksatsiini sisaldus. Taimedest oli fluorokinolonide sisaldus suurim salatis ja väiksem kurgis (tabel 5). Kõrge tsiprofloksatsiini kontsentratsioon salati puhul võib olla tingitud sellest, et viimast kasvatati tsiprofloksatsiiniga segatud mullas 14 päeva kauem kui teisi taimi. Fluorokinolonide nominaalkontsentratsioonil 10 µg/g kasvanud taimedest ei andnud inhibitsioonitsooni ükski, välja arvatud salat, mida oli kasvatatud tsiprofloksatsiini juuresolekul kauem. Oder ja kurk andsid inhibitsioonitsooni ainult kõige kõrgemal nominaalkontsentratsioonil mullas. Märkimisväärne on see, et salatis, mis oli kasvanud mulla tsiprofloksatsiini nominaalkontsentratsioonil 10 µg/g, määrati nominaalsest üle 4 korra suurem tsiprofloksatsiini sisaldus. Inhibitsioonitsooni diameeter oli küll väiksem, mida on võimalik mõõta – 7 mm (analüüsitud materjal söötmel 6 mm) –, kuid spaiksalat ei andnud kontsentratsioonidel 10 ja 20 µg/g üldse bakterikasvu inhibitsiooni, seega on tulemus usaldatav. Tulemus näitab, et pikema kasvuaja puhul võib antibiootikum taimes ka kontsentreeruda.

**Tabel 5.** Fluorokinolonide sisaldus taimedes

**Table 5.** Concentration of Fluoroquinolones in Plants

Taim / Plant	Algkonts. mullas Initial conc. in soil, µg/g	Enrofloksatsiin / Enrofloxacin		Tsiprofloksatsiin / Ciprofloxacin	
		i d, mm	konts. / conc., µg/g	i d, mm	konts. / conc., µg/g
Oder / Barley	500	20	20	11,5	13
	200	15	14	–	–
	50	7	8	–	–
	10	–	–	–	–
Salat / Lettuce	500	25	76	16	223
	200	18	27	14,25	163
	50	9	7	8,5	58
	10	–	–	7	44
Kurk / Cucumber	500	21	36	13	40
	200	16	22	–	–
	50	7	9	–	–
	10	–	–	–	–

\*i d – inhibitsioonitsooni diameeter mm / diameter of inhibition zone

### Kromatograafiline võrdlusanalüüs HPLC-meetodil

Et kontrollida akumuleerunud fluorokinolonide säilumist katsetaimedes, tehti 10 kuud pärast taimede kogumist kromatograafiline võrdlusanalüüs. Selleks valiti salat, mis oli kasvanud enrofloksatsiini juuresolekul. Kromatograafiline meetod võimaldab välja selgitada, kas enrofloksatsiin taimes on osaliselt metaboliseerunud tsiprofloksatsiiniks, samuti määrata nende kahe fluorokinolooni summaarset sisaldust taimes. Kuivatatud taimset materjali säilitati kinnistes plastikuubides pimedas ruumis toatemperatuuril 10 kuud.

Analüüsiks võeti mulla kõikidel enrofloksatsiini nominaalkontsentratsioonidel kasvanud salatitaimed. Kromatogramm näitasid, et enrofloksatsiin oli säilinud kõikides proovides ja osaliselt metaboliseerunud tsiprofloksatsiiniks. Enro- ja tsiprofloksatsiini summaarne sisaldus salatis HPLC-meetodi järgi oli algkontsentratsioonidel 500, 200, 50 ja 10 µg/g vastavalt 12,7; 3; 1 ja 0,37 µg/g (tabel 6). Saadud tulemusi võrreldi mikrobioloogilise meetodiga määratud enrofloksatsiini sisaldustega salatis. Mikrobioloogiline meetod saab näidata ainult antibakteriaalsete ainete summaarset sisaldust uuritavas materjalis. Kromatograafia näitas, et enrofloksatsiini juuresolekul kasvanud salat sisaldas ka tsiprofloksatsiini. Kas nimetatud metaboliit oli tekkinud taimes või juba eelnevalt mullas, on ilma täiendavate uuringuteta raske öelda. Mikrobioloogilise meetodiga määratud enrofloksatsiini sisaldus salatis oli mitu korda suurem, kui kromatograafilise meetodiga saadud kontsentratsioonid. Suure tõenäoliselt fluorokinoloonid taimses materjalis 10 kuu jooksul osaliselt lagunevad.

Mikrobioloogilise meetodiga vahetult pärast eksperimendi lõppu määratud suured fluorokinolonide sisaldused võivad viidata ka teiste antimikroobselt aktiivsete metaboliitide tekkele. Ka kirjanduses on andmeid, et

loomorganismis võib enrofloksatsiinist peale tsiprofloksatsiini tekkida ka seni tundmata metaboliite (Küng *et al.*, 1993). Viimased kas lagunevad hiljem või on siis kromatograafiliselt määratavad teistel lainepikkustel.

**Tabel 6.** Fluorokinolonide sisaldus salatis HPLC-meetodi järgi

**Table 6.** Concentration of Fluoroquinolones in Lettuce by HPLC Method

Enrofloksatsiini algkonts. mullas, µg/g <i>initial conc. of enrofloxacin in soil, µg/g</i>	Enrofloksatsiini konts., µg/g <i>enrofloxacin conc., µg/g</i>	Tsiprofloksatsiini konts., µg/g <i>ciprofloxacin conc., µg/g</i>	Enro + tsipro konts., µg/g <i>conc.enrofloxacin + ciprofoxacin, µg/g</i>	Tekkinud tsipro, % <i>ciprofloxacin formed, %</i>
500	10,8	1,9	12,7	15
200	2,4	0,6	3	20
50	0,8	0,2	1	20
10	0,3	0,07	0,37	19

Kromatograafiline meetod näitab fluorokinolonide sisaldust salatis ka väikseimal mulla enrofloksatsiini algkontsentratsioonil. Kontsentratsioon 0,37 µg /g jääb alla mikrobioloogilise meetodi määramispiiri. Seetõttu sobib fluorokinolonide väga väikeste sisalduste määramiseks ainult kromatograafiline meetod. Mikrobioloogilise meetodi eelis on see, et ta on lihtsam, odavam ja näitab ära enrofloksatsiini ning tema tuntud ja tundmatute metaboliitide summaarse antimikroobse aktiivsuse.

## Järeldused

Eksperimendi tulemused näitavad, et pikema kasvuaja jooksul võib salatisse akumulereuda küllalt palju ühel või teisel viisil mulda sattunud antibiootikumi. Võimalik, et ka teistes taimedes oleks fluorokinolonide sisaldus pikema kasvuaja järel suurem. Kui toetuda kirjanduse andmetele (Halling-Sørensen *et al.*, 2002), võiks enrofloksatsiini ja tema metaboliitide summaarne sisaldus sõnnikuga väetatud mullas olla halvimal juhul 3,8 µg/g. Mikrobioloogilise meetodiga määrati mulla tsiprofloksatsiini kontsentratsioonil 10 µg/g kasvanud salatis tsiprofloksatsiini sisalduseks 44 µg/g. See on taimes üle 4 korra suurem, kui oli kasvumullas. Et enrofloksatsiini sisaldus oli taimedes üldiselt suurem, võib arvata, et salati pikema kasvuaja jooksul enrofloksatsiiniga mullas see isegi ületaks tsiprofloksatsiini sisalduse. Lihtne arvutus näitab, et kui mulla tsiprofloksatsiini kontsentratsioonil 10 µg/g jõudis taimesse 42 päeva jooksul fluorokinolooni 44 µg/g, siis mulla kontsentratsioonil 3,8 µg/g võiks taimesse jõuda sama kontsenteerumisastme korral ligikaudu 15 µg/g. Selline kontsentratsioon peaks olema määratav ka lihtsa mikrobioloogilise agar-difusioonmeetodiga.

Loomses toidutoormes on enro- ja tsiprofloksatsiini summaarse sisalduse lubatud piirnorm MRL 100 µg/kg ehk 0,1 µg/g. 15 µg/g taimse materjali kohta ületaks selle väärtuse mitmekordselt. Ka 10 kuu pärast kromatograafilise meetodiga määratud fluorokinolonide summaarne sisaldus 0,37 µg/g on üle piirnormi. Veelgi pikema kasvuaja puhul võiks fluorokinolooni taimes olla veelgi suuremas koguses. Itaalias on tõstatatud küsimus MRLi vajadusest veterinaarravimite jääkidele taimedes (Brambilla *et al.*, 1996). Võib-olla tasuks selle üle mõelda ka Eestis? Oleks vaja uurida ravimijääkide sisaldust sõnnikuga väetatud mullas ja pikema kasvuperioodiga taimedes. Ravimijääke võib olla rohkem juurviljades ja köögiviljades, mille söödav osa on mullas (Brambilla *et al.*, 1996). Inimesele ohtlik võiks olla ravimijääkide sisaldus kartulis, sest kartuli kasvuaeg on pikk, söödav osa on mullas ja kartulit süüakse Eestis keskmiselt rohkem kui teisi toidutaimi. Igapäevatoiduga väikestes kogustes pidevalt omastatavad fluorokinolonid võiksid põhjustada resistentsete bakteritüvede tekkimist inimorganismis.

## Kokkuvõte

Käesolevas töös uuriti fluorokinolonide säilumist mullas ja nende akumulereumist toidutaimedes. Eksperimendiks valiti 3 taime: lehtsalat, oder ja harilik kurk, mida kasvatati laboratooriumis enro- või tsiprofloksatsiiniga segatud mullas nominaalkontsentratsioonidel 500, 200, 50 ja 10 µg/g. Fluorokinolonide sisalduse määramiseks mullas ja taimedes töötati välja mikrobioloogiline agar-difusioonmeetod. Testorganismiks oli *Bacillus subtilis*. Eksperiment kestis 28 päeva, salati puhul tsiprofloksatsiiniga mullas 42 päeva. Põhitulemused on järgmised.

- Mullas püsis fluorokinolonide kontsentratsioon eksperimendi jooksul muutumatuna.

- Enrofloksatsiini sisaldus tuvastati kõigis mulla enrofloksatsiini kontsentratsioonidel 500, 200 ja 50 µg/g kasvanud taimedes. Enrofloksatsiini algkontsentratsioonil 10 µg/g kasvanud taimedes mikrobioloogiline meetod fluorokinolooni sisaldumist ei näidanud.
- Tsiprofloksatsiini sisaldumine tuvastati odras ja kurgis ainult mulla algkontsentratsioonil 500 µg/g.
- Kauem kasvatatud salatis leiti tsiprofloksatsiini kõikidel mulla algkontsentratsioonidel. Mulla nominaalkontsentratsioonil 10 µg/g oli tsiprofloksatsiini sisaldus suurem kui kasvumullas – 44 µg/g. Seega võivad fluorokinoloonid pikema kasvuaja jooksul taimes kontsentreeruda.
- Kromatograafilise HPLC-meetodiga kontrolliti 10 kuu pärast fluorokinoloonide sisaldust salatis, mis oli kasvanud enrofloksatsiiniga segatud mullas. Osaliselt oli enrofloksatsiin metaboliseerunud tsiprofloksatsiiniks. Fluorokinoloonide summaarne sisaldus salatis oli väiksem kui vahetult pärast eksperimendi lõppu mikrobioloogilise meetodiga määratud sisaldus. Järeldatakse, et 10 kuu jooksul taimesse akumuliseerunud fluorokinoloonid osaliselt lagunevad. Kromatograafiline meetod näitas enrofloksatsiini ja tsiprofloksatsiini sisaldust salatis ka kõige madalamal mulla algkontsentratsioonil 10 µg/g, kus mikrobioloogiline meetod ei näidanud: summaarne fluorokinoloonide sisaldus salatis 0,37 µg/g oli suurem kui fluorokinoloonide lubatud maksimaalne sisaldus loomses toidutoormes – 0,1 µg/g.
- Arutluse alla tuleks võtta ravimijääkide piirnormi vajalikkus toidutaimedes.
- Väljatöötatud mikrobioloogiline agar-difusioonmeetod fluorokinoloonide määramiseks mullas ja taimedes sobib kohandamiseks ka teistele ravimijääkidele.

## Kirjandus

- Aruksaar, A., Püssa, T., Kuldkepp, P., Ivask, M. Antibakteriaalsete veterinaarravimite mõju taimede kasvule ning ravimijääkide akumuliseerumine taimedes. – Akadeemilise Põllumajanduse Seltsi Toimetised, nr 9, lk 5–8, 1999.
- Brambilla, G., Casoria, P., Civitareale, C., Cozzolino, S., Gaudio, L., Migliore, L. Sulphadimetine as Environmental Tracer to Evaluate Phytotoxicity in Crop. – Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food, Proceedings, p. 292–295, Veldhoven, 6–8 May, 1996.
- Crumplin, G. C. The Mechanism of Action of Quinolones, in: Quinolones – Their Future in Clinical Practice. – Int. Congr. Symp. Ser – R. Soc. Med., No. 104, p. 1–15, 1986.
- Golet, E. M., Strehler, A., Alder, A. C., Giger, W. Determination of Fluoroquinolone Antibacterial Agents in Sewage Sludge and Sludge-Treated Soil Using Accelerated Solvent Extraction Followed by Solid-Phase Extraction. – Anal. Chem., No. 74, p. 5455–5462, 2002.
- Halling-Sørensen, B., Nors Nielsen, S., Lanzky, P. F., Ingerslev, F., Holten Lützhof, H. C., Jørgensen, S. E. Occurrence, Fate and Effects of Pharmaceuticals in the Environment. – Chemosphere, No. 36 (2), p. 357–393, 1998.
- Halling-Sørensen, B., Nors Nielsen, S., Jensen, J. Environmental Assessment of Veterinary Medicinal Products in Denmark. – Environmental Project, No. 659, p. 18–34, 2002.
- Küng, K., Riond, J. L., Wanner, M. Pharmacokinetics of Enrofloxacin and its Metabolite Ciprofloxacin after Intravenous and Oral Administration of Enrofloxacin in Dogs. – J. Vet. Pharmacol. Ther., No. 16, p. 462–468, 1993.
- Marengo, J. R., Kok, R. A., O'Brien, G. K., Velagaletti, R. R., Stamm, J. L. Aerobic Degradation of 14C-Sarafloxacin Hydrochloride in Soil. – Environm. Toxicol. and Chemistry, No. 16 (3), p. 462–471, 1997.
- Mengozzi, G., Intorre, L., Bertini, S. Pharmacokinetics of Enrofloxacin and its Metabolite Ciprofloxacin After Intravenous and Intramuscular Administrations in Sheep. – Am. J. Vet. Res., No. 57 (7), p. 1040–1043, 1996.
- Migliore, L., Brambilla, G., Cozzolino, S., Gaudio, L. Effects on Plants of Sulphadimethoxine Used in Intensive Farming (*Panicum miliaceum*, *Pisum sativum* and *Zea mays*) – Agric. Ecosyst. Environm., No. 52., p. 103–110, 1995.
- Migliore, L. Method for Enrofloxacin Determination in Plants (modification from Palmada *et al.*, 2000). – Via della Ricerca Scientifica, Roma, 2001.
- Montay, G., Goueffon, Y., Roquet, F. Adsorption, Distribution, Metabolic Fate and Elimination of Pefloxacin Mesylate in Mice, Rats, Dogs, Monkeys and Humans. – Antimicrob. Agents and Chemother., No. 25, p. 463–472, 1984.
- Nekrassova, O. Chromatographic Methods for Determination of Some Antibiotics from Soil. – MSc Thesis, Environmental Protection Institute of EAU, Tartu, 2001.
- Nowara, A., Burhenne, J., Spittler, M. Binding of Fluoroquinolone Carboxylic Acid Derivates to Clay Minerals. – J. Agric. Food Chem., No. 45, p. 1459–1463, 1997.

- Palmada, J., March, R., Torroella, E., Espigol, C., Baleri, T. Determination of Enrofloxacin and its Active Metabolite (Ciprofloxacin) at the Residue Level in Broiler Muscle Using HPLC with Fluorescence Detection. – References of Euroresidue IV, p. 822–826, Veldhoven, 8–10 May, 2000.
- Riigi Teataja I, 6, 38. Toidus lubatud saasteainete loetelu ja piirnormide toidugruppide kaupa kehtestamine. – VVm nr 14, lisa 3, 2000.
- Stuer-Lauridsen, F., Birkved, M., Hansen, L. P., Holtén Lützhoff H-C., Halling-Sørensen, B. Environmental Risk Assessment of Human Pharmaceuticals in Denmark After Normal Therapeutic Use. – *Chemosphere*, No. 40, p. 783–793, 2000.
- Stumpf, M., Ternes, T. A., Wilken, R-D., Rodrigues, S. V., Baumann, W. Polar Drug Residues in Sewage and Natural Waters in the State of Rio de Janeiro, Brazil. – *Sci. Tot. Environ.*, No. 225, p. 135–141, 1999.
- Tshervjakova, V. Terezova, A. Farmakoloogia ja retseptuur. – Tallinn, “Valgus” 1986, lk. 98–112.

## Drug Residues in Environment. Estimation of Fluoroquinolones in Soil and Food Plants

M. Lillenberg, M. Roasto, T. Püssa

### Summary

Drugs as an essential part of modern human and veterinary medicine are absorbed, distributed, metabolised and finally excreted from organism. After excretion drugs and their metabolites can contaminate the environment. Residues of pharmaceuticals used in human medicine occur in water upon passing sewage treatment plants. Veterinary drugs can enter the environment directly by slurry and manure used as fertilizers. Medical substances used on fish farms will be exposed directly to the receiving waters (Halling – Sørensen *et al.*, 2002). Very little is still known about the actual fate of drugs in the environment. The medical substances have many of the necessary properties to bioaccumulate and provoke effects both in the aquatic and terrestrial ecosystems. Veterinary drugs can be uptaken by plants growing in soil fertilised with manure. In such way drug residues can finally reach human as well as animal food.

Fluoroquinolones are broad spectrum synthetic antibiotics used both in human and veterinary medicine. In order to restrict the development of cross resistance the fluoroquinolones used in human medicine are not generally used in veterinary practice and *vice versa*. There still exists a couple of very closely related fluoroquinolones – enrofloxacin and ciprofloxacin. The first one is widely used in veterinary medicine and the second one is licensed for human medicine. Ciprofloxacin is the main metabolite of enrofloxacin in animal organism. After excretion enrofloxacin and its metabolites occur with manure in soil. It has been shown that both fluoroquinolones are strongly adsorbed to soil and stable for a long time. Fluoroquinolones may be able to move with soil water into food plants and accumulate there. These tiny amounts of broad spectrum antibiotics in everyday food may generate the strains of resistant microorganisms in human and animal organism. Bacterial resistance in turn is the well known painful problem in chemotherapy. Today nothing is known about accumulation of fluoroquinolones in plants, therefore method of quantitative assay of these compounds was needed.

Content of two fluoroquinolones – enrofloxacin and ciprofloxacin – was studied in soil and in three food plants: barley (*Hordeum vulgare*), lettuce (*Lactuca sativa*) and cucumber (*Cucumis sativus*) cultivated in this soil. The plants were grown in plastic pots, filled with soil amended with either enrofloxacin or ciprofloxacin (initial concentrations of both 500, 200, 50 or 10 µg/g soil). Experiment lasted from seeding to harvesting 28 days, only in case of lettuce in presence of ciprofloxacin longer – 42 days.

Microbiological agar-diffusion method was elaborated for estimation of the concentration of fluoroquinolones both in soil and plants. In the role of test organism the fluoroquinolone sensitive bacterium *Bacillus subtilis* was used.

### Microbiological Agar-Diffusion Method for Estimation of Fluoroquinolones in Soil and Plants

Testbacterium. *B. subtilis* BGA or ATCC 6633 spore suspension.

Solutions. Water solution of trimethoprim 100 µg/ml (TMP), water solutions of enrofloxacin and ciprofloxacin 0.5; 1; 2; 5; 10; 20; 40 and 80 µg/ml.

Test medium. Test agar pH 8 from Merck, prepare according to instructions of producer and sterilise in autoclave 50 min under 1 bar. After decreasing the temperature of test agar to 48 °C, add the solution of TMP 100 µl/100ml.

- Inoculum. Add spore suspension of *B. subtilis* 1ml/100ml.
- Test amount. Fill Petri dishes Ø 90 mm with 6 ml of inoculated test agar.
- Spiking of soil. In order to prepare calibration soils, mix 2 g of air-dry drug-free plant growth soil with 10 ml of fluoroquinolone solution in 50 ml plastic centrifuge tubes by end-over-end method during 5 hours at room temperature. Centrifuge tubes at 4000 rpm during 30 min. Remove supernatants by decantation. Dry sediments on plastic Petri dishes at room temperature overnight. Solutions of fluoroquinolones with concentrations of 0.5; 1; 2; 5; 10; 20; 40 and 80 µg/ml will give the calibration soils with concentrations of 2.5; 5; 10; 25; 50; 100; 200 and 400 µg/g respectively. Sterilise soils in autoclave 30 min. under 1 bar.
- Spiking of plants. In order to prepare the calibration plants, mix 50 mg of dried and ground leaves and stems of 3 different plants grown in fluoroquinolone-free soil with 1 ml of following antibiotic solutions in water: 0.5; 1; 2; 5 and 10 µg/ml in 2ml plastic tubes. Rotate tubes end-over-end during 3 hours at room temperature and centrifuge 4000 rpm 10 min. Remove supernatants by a plastic Pasteur pipette into 1 ml Eppendorf tubes. Dry sediments on plastic Petri dishes at room temperature overnight.
- Samples. 2,5 mg ground dry plant material or 5 mg autoclaved soil.
- Microbial inhibition test. Inoculated culture medium is ready for test after gelifying during 30 min. on Petri dish. Put the stainless steel cylinder Ø 6 mm on the gel. Pour 2.5 mg plant material or 5 mg soil on the gel through cylinder. Remove cylinder. In case of solutions of antibiotics or spiking supernatants dip 13.6 µl of the solution on 6 mm blank paper disk. Test on the same gel control samples and spiked samples. Test all samples in two parallels. Keep Petri dishes with samples in refrigerator at 4–6 °C during 22 hours for pre-diffusion and thereafter incubate during 18 hours at 37 °C. The inhibition circle of microbial growth will appear. Measure the diameter of the inhibition circle. Take the average of two parallel samples.
- Calibration soils. The adsorption rate of fluoroquinolones to soil is close to 100%. Use measured average diameters of spiked soils for constructing the calibration curves in axes: log from antibiotic concentrations (x) and diameter of inhibition circles (y) of spiked soils.
- Calibration plants. The adsorption rate of fluoroquinolones to plants is less than 100%. It depends on plant and concentration of spiking solution. Find out the rate of adsorption. Analyse spiking solutions and supernatants by microbial inhibition test. Construct the calibration curve in axes: log from concentrations (x) and diameter of inhibition circles (y) of spiking solutions. The concentration of antibiotic in supernatant shows the adsorption rate. If supernatant gives the inhibition circle, find the concentration of antibiotic in supernatant using the calibration curve. Calculate the % of adsorption of antibiotic to plant material and concentration of antibiotic in spiked plants. If the supernatant doesn't give the inhibition circle, all the added antibiotic is adsorbed by plant material – the adsorption rate is 100%. Construct the calibration curve in axis: log from calculated concentration of antibiotic in spiked plants (x) and diameter of inhibition circle of spiked plants. To find out the concentration of antibiotic in plant samples use last calibration curve, different for every plant.
- Calculations. Calculate the concentration of antibiotic in soil and plant samples using equation of calibration curve  $y = ax + b$ , where a and b are constants, x = log from concentration of antibiotic in sample and y = diameter of inhibition circle of sample. Concentration of antibiotic in sample =  $10^x$ .
- HPLC method. For estimation of fluoroquinolones in plants by HPLC use method of J. Palmada (Palmada *et al.*, 2000), modified by L. Migliore (Migliore, 2001).

### **Results and conclusion**

The content of fluoroquinolones in soil didn't change remarkably during the experiment time. The difference of concentrations was in limits of error (in concentrations 500, 200, 50 and 10 µg/g error in diameter of inhibition circles was ± 2; 2; 1.5 and 1 mm, respectively) (tables 1, 2). The averages of drug concentrations of three soil samples taken on the 2., 14. and 28. day of experiment were close to nominal drug concentrations in soil (table 3, 4).

Making use of agar-diffusion method the accumulation of fluoroquinolones in all plants grown at highest drug nominal concentration (500 µg/g) was approved. Enrofloxacin was discovered in all plants grown at drug nominal concentrations 500, 200 and 50 µg/g). At the lowest nominal concentration (10 µg/g) the presence of enrofloxacin in plants was not detected. Ciprofloxacin in barley and cucumber was discovered only in plants grown at drug nominal concentration 500 µg/g. In general, enrofloxacin accumulated in plants better than ciprofloxacin. In lettuce, cultivated during 42 days, ciprofloxacin was found at all nominal drug concentrations. The level of ciprofloxacin in plant (44 µg/g) was considerably higher, than nominal concentration of ciprofloxacin in soil (10 µg/g). It means that ciprofloxacin is accumulated and concentrated by lettuce (table 5).

The presence of enrofloxacin in lettuce leaves kept in dried state during 10 months was studied making use of chromatographic (HPLC) method. The chromatograms showed that beside enrofloxacin lettuce contained also ciprofloxacin (table 6). The agar-diffusion method applied directly after finishing of plant growing experiment revealed higher contents of enrofloxacin than the sum of contents of enro and ciprofloxacin determined by HPLC method.

It can be concluded, that during time both enro- and ciprofloxacin undergo partial degradation in the plant material. It is supposed, that beside ciprofloxacin other antibacterially active metabolites of enrofloxacin are formed in lettuce. After 10 months, the sum of enro- and ciprofloxacin in lettuce, cultivated in soil with nominal concentration of enrofloxacin 10 µg/g, was 0.37 µg/g by HPLC method. It exceeded the MRL 0,1 µg/g (100 µg/kg), fixed for the content of fluoroquinolones in food of animal origin. A discussion concerning necessity fixing of MRL values for antibiotic residues in food plants is included.

Elaborated microbiological agar-diffusion method for estimation of the concentration of fluoroquinolones in soil and plants can be modified for other antibiotic residues.