

MÕNINGATE ANTIBAKTERIAALSETE VETERINAARRAVIMITE MÕJU ODRA JA REDISE KASVULE

A. Aruksaar, T. Püssa, P. Kuldkepp, M. Ivask

Veterinaarmeditsiinis infektsioonhaiguste profülaktikaks ja massiteraapiaks, aga ka söödalisandites loomade kasvustimulaatoritena kasutatavad antibakteriaalsed ravimid (eriti puhtsünteetilised antibiootikumid, sulfoonamiidid jt.) on enamuses organismis raskestiimenduvad ja ainult osaliselt metaboliseeruvad, mistõttu nad satuvad suures osas keemiliselt muutumatutena sõnnikusse ja viimase kasutamisel väetamiseks ka mulda (Migliore *et al.*, 1995; Martens *et al.*, 1996). Sageli on ka ravimainete metaboliidid antibakteriaalse toimega. Mullas on aga vähe organisme, kes on võimelised neid degradeerima. Nii on näiteks enro- ja tsiprofloksatsiine võimelised lagundama vaid teatud seemned (Martens *et al.*, 1996). Mullast võivad ksenobiootikumide akumulatsioonid taimed, mis avab neile mürkidele toiduuhelat pidi tee looma ja inimese organismi (Brambilla *et al.*, 1996; Migliore *et al.*, 1995). Teisalt võivad antibakteriaalsed ained muuta mulla mikroobikoostlust, mis viib nende suhtes resistentsete tüvede arenemisele ning mulla viljakuse ja ka vastupanuvõime alanemisele taimekaitsevahenditele ja teistele ksenobiootikumidele (Migliore *et al.*, 1995). Vees vähemlahustuvad ravimid võivad sõnnikule või teistele mulla tahketele komponentidele kinnitunuina ja degradeerivaile mikroorganismidele raskesti kättesaadavana mõjustada mulda pikema aja jooksul (Scow *et al.*, 1995; Martens *et al.*, 1996). Enamlahustuvad toimeained, liikudes kiiresti põhjavette, põhjustavad selle akuutse reostumise (Dojmi di Delupis *et al.*, 1992).

Probleemi tõsidusest on alles hiljuti hakatud aru saama, mistõttu asjakohaseid uurimusi on avaldatud veel ülivähe (van Gool, 1993; Migliore *et al.*, 1995). Nii on sulfadimetoksiini akumulatsioonid odras, hirsis, maisis ning aedhernes tõestanud rühm Itaalia teadlasi (Migliore *et al.*, 1995; Brambilla *et al.*, 1996), kes on kindlaks teinud ka selle sulfoonamiidide klassi kuuluva ravimi taimekasvu pärssiva toime. Seni on aga täiesti uurimata nende ravimite mõju mulla mikroorganismidele ning viimaste kaudu taimedele. Itaallaste teedrajavate katsete tulemused aga hoiatavad ning viitavad selliste uuringute hädavajalikkusele ka Eesti tingimustes, seda eriti loomade kõrge kontsentratsiooni ja intensiivse sõnnikukasutusega aladel. Euroopa Liidus on alates 1992. aasta märtsist uuele veterinaarravimile müügilitsentsi taotleval firmal kohustatud tegema selle ravimi keskkonnamõju hindamist (Environmental Risk Assessment=ERA) vastavalt dokumendile Commission Directive 92/18/EEC.

Käesolevas artiklis anname ülevaate kahe puhtsünteetilise antibakteriaalse veterinaarravimi – sulfadimetoksiini (sulfoonamiidid) ja tsiprofloksatsiini (fluorokinoloonid) – ning loodusliku päritoluga oksütetratsükliini (tetratsükliinid) mõju uurimisest odra (*Hordeum vulgare* L.) ning redise (*Raphanus sativus*) kasvule *in vivo* laboratoorses tingimustes toitainetevaeses mullas. Ravimite valikul lähtuti lisaks kuuluvusele erinevatesse aineklassidesse ka nende suhteliselt suurest kasutatavusest Eesti loomakasvatuses (ravimifirmade andmeil).

Materjalid ja meetodika

Taimeseemned: hiline oder 'Leelo', redis 'Novired'.

Muld: Eerika IOSDV katsepõllult võetud näivleeturund mulla huumushorisont, mille olulisemad agrookeemilised näitajad olid järgmised: N – 0,100%; P – 8,36 mg/100 g; K – 13,0 mg/100 g; Na – 1,6 mg/100 g; orgaaniline aine (350°C) – 2,0%; pH_{KCl} – 5,97.

Antibakteriaalsed ravimid: sulfadimetoksiin (*sulfadimethoxinum* – Tallinna Farmaatsiatehas), tsiprofloksatsiin (*ciprofloxacinum*) (KRKA, Sloveenia); oksütetratsükliin (*oxytetracyclinum* – Interchemie Werken "De Adelaar", Holland). Kasutatud kontsentratsioonid: sulfadimetoksiin ja oksütetratsükliin – 50 ja 100 mg/kg mulla kohta, tsiprofloksatsiin 50 mg/kg.

Analüüsireagendid: firmadelt Sigma, Aldrich, Fluka – puhtusaste p.a. ja Reahim.

Meetodika. Muld koguti katselappidelt, mida ei olnud 8 aastat väetatud, sõeluti ja jaotati 5 kg kaupa plastmassist nõudesse. Igasse nõusse lisati 5 kg mulda, millesse oli ühtlaselt segatud vajalik kogus ravimit. Igasse nõusse külvati 40 odra või 30 redise seemet. Katsenõud paigaldati kunstliku valgustuse alla ning mulda kasteti vastavalt vajadusele. Redisetaimi jäeti kasvama 10 tükki nõu kohta.

Katse lõpetamisel eemaldati taimed mullast, juured loputati kraaniveega, odrataimedel mõõdeti võrsete pikkus; taimed kaaluti, eraldati teineteisest juured ja võrsed, kumbki osa kaaluti eraldi ning nii pealsetes kui ka juurtes määrati N-, P-, K-, Mg- ja Ca-sisaldus. Analüüsides ülejäänud osa säilitatakse sügavkülmas antibakteriaalsete ainete sisalduse vedelikkromatograafiliseks määramiseks. Ka mullast võeti iga etapi järel proovid keemilisteks, kromatograafilisteks ja mikrobioloogilisteks analüüsideks. Mullas määrati standardmeetoditega kuivaine, pH_{KCl}, orgaaniline aine (kuumutuskadu temperatuuril 350 °C), omastatavad N, P, K ja Na ning mikroorganismide summaarset aktiivsust iseloomustav hüdrofüütiline (esteraasne) aktiivsus fluorestseindiatsetaadi suhtes (Schnürer *et al.*, 1982).

Ühe ja sama mullaga tehti järgmine katseseeria: I – oder, 25 päeva; II – oder, 25 päeva, III – redis, 65 päeva, kusjuures vahepeal antibakteriaalset ravimit ega toitaineid ei lisatud. Katsed sooritati kolmes (kontrollmulla korral kuues) korduses.

Katsetulemused ja arutelu

Ravimite kontsentratsioonideks mullas oli valitud Itaalia teadlaste poolt sulfadimetoksiini korral kasutatud 100 mg/kg (Brambilla *et al.*, 1996) ning sellest kaks korda madalam 50 mg/kg mulla kohta. Sellised kontsentratsioonid on küll suhteliselt kõrged, kuid itaallaste arvestuste kohaselt vähemalt sulfadimetoksiini jaoks tänu madalale absorbeeruvusele suu kaudu manustamisel ning kõrgele stabiilsusele täiesti saavutatavad. Tegelikult toimiv, mikroorganismidele ja taimedele kättesaadav ravimi kontsentratsioon on muidugi teadmata, olles eri ravimitel erineva sorptsiooni tõttu mulla osakestele erinev ning nominaalkontsentratsioonist kindlasti madalam.

Taimede kasvu iseloomustavad parameetrid kõigilt katsetelt on toodud tabelites 1...3. Neist ilmneb, et kõik kasutatud antibakteriaalsed ained omavad kasutatud kontsentratsioonidel taimekasvu pidurdavat toimet, kusjuures kaugelt kõige tugevam on sulfadimetoksiini mõju. Nii alanes viimase mõlemal kontsentratsioonil mullas 1 odrataime mullapealse osa e. võrsete keskmine pikkus katses I umbes 2 korda, järelmõju katses II koguni 3 korda kontrollmullaga võrreldes (tabel 1). Odrataime keskmine toorkaal alanes esimeses katses 2,9 korda, järelmõjukatses koguni 3,3 korda (tabel 2), ka oli katse lõpuks säilinud taimede arv ravimi manulusel oluliselt väiksem. Paljud säilinud taimedest olid katsete lõpuks kas kolletunud või kuivanud. Tabelist 2 ilmneb veel, et kui katses I alanes ligikaudu võrdselt nii taime juurte kui ka võrsete kaal, siis oli järelmõju katses II taime kaalu täiendav alanemine põhjustatud ainult võrsete kaalu täiendavast alanemisest. Juure kaal jäi samale tasemele nagu katses I. Seemnete idanevus oli kõigil tingimustel >80%. Kokkuvõttes leidis Itaalia teadlaste uurimistulemus odra korral kinnitust, aga veel selgemal kujul. Mõju mehhanismiks on itaallased välja pakkunud DNA sünteesiks vajaliku foolhappe sünteesi pärssimise rakus (Brambilla *et al.*, 1996; vt. ka näit. Zubay, 1993).

Redise korral oli järelmõju katse (katse III) tulemus veelgi huvitavam (vt. tabel 3). Kui kontrollmullas ja ka kummagi antibiootikumi lisamisel oli idanevus >90%, siis sulfadimetoksiini kõrgemal kontsentratsioonil vaid 10%, 30-st seemnest idanes eri nõudes 2...3 ning sedagi 2-nädalase hilinemisega nii kontrollmulla kui ka kummagi antibiootikumiga mullaga võrreldes. Kolme nõu peale kokku jõudis 8 tärgranud taimest juurika kasvatamiseni aga vaid 1. Samas on aga huvitav, et see sulfadimetoksiini suhtes mingil põhjusel mittetundlik taim kasvas oma üksindust kasutades ka kõige suurema juurika üldse. Sulfadimetoksiin põhjustas mõlemal kontsentratsioonil ühe juure keskmise kaalu alanemise, eriti kui jätta arvestamata kõrgemal kontsentratsioonil kasvanud üks ülisuur juurikas.

Ka tsiprofloksatsiin pärssis (katses I) odrataimede, eriti juurte kasvu, kuigi kaugeltki mitte nii tugevasti kui sulfadimetoksiin. Tema manulusel tekkis aga 10 (katse I) või 20 (katse II) protsendi ulatuses alandatud klorofüllisisaldusega albiino taimi, kusjuures depigmentatsioon arenes välja just taime vanemas osas. Tegemist võib olla antibiootikumi mõjuga klorofüllü sünteesiks vajaliku magneesiumi omastamisega seotud mikroobidele. Ka redise korral täheldati depigmentatsiooni, magneesiumi kontsentratsioon nende taimede pealsetes ei erinenud aga kontsentratsioonist kontrollmullas kasvanud taimedes. Hüpotees vajab põhjalikumalt kontrollimist. Redise seemnete idanevus oli sama kõrge kui kontrollmullas, keskmine juure kaal aga veidi väiksem (tabel 3).

Oksütetratsükliini mõju oli kõige nõrgem, redise korral võib siiski täheldada juure keskmise kaalu mõningat alanemist antibiootikumi kõrgemal kontsentratsioonil.

Olulisi erinevusi taimede keemilises koostises uuritud piires ei täheldatud.

Kokkuvõte. Katsetest järeldub, et kõik kasutatud ravimid pärssivad odra- ja redisetaimede kasvu, kuid erineval määral. Kaugelt kõige tugevam on sulfadimetoksiini mõju, mille korral on ilmselt tegemist tugeva taimemürgiga.

Et mulla esteraasne aktiivsus oli sulfadimetoksiini manulusel katsetes II ja III märgatavalt inhibeeritud (arvud siinkohal toomata), võib otsemõjule lisanduda ka kaudne mõju mulla mikroorganismidele.

Tsiprofloksatsiin põhjustab osaliselt valgete taimede teket. Meie poolt välja pakutav mehhanism vajab kontrollimist.

Kavas on teha katsetes kasutatud mulla ja taimede kromatograafiline analüüs, mille tulemuste alusel saaks teha järeldusi katsetatud ravimite säilivuse kohta mullas ning omastatavuse kohta taimede poolt; uurida mõju sõltuvust sulfadimetoksiini kontsentratsioonist laiemas vahemikus; suurendada katsetatavate ravimite ringi ning teha katseid erineva koostisega muldades.

Tabel 1. Odrataime võrsete keskmine pikkus**Table 1.** Average length of barley shoots

Ravim <i>Drug</i>	Konts. <i>Conc</i> mg/kg	Katse / <i>Experiment I</i>			Katse / <i>Experiment II</i>		
		taimede arv* <i>No. of plants*</i>	pikkus length (cm)	%kontrollist <i>% of control</i>	taimede arv* <i>No. of plants*</i>	pikkus length (cm)	%kontrollist <i>% of control</i>
Kontroll <i>Control</i>	0	36,4±2,5	32,4±4,6	100	32,2±2,6	32,1±4,3	100
Oksütetratsükliin <i>Oxytetracyclin</i>	50	33,7±4,3	30,8±5,2	95,0	29,7±5,3	30,5±4,8	95
Tsiprofloksatsiin <i>Ciprofloxacin</i>	100	36,0±0,7	32,0±5,2	99,0	34,0±3,1	33,3±4,1	105
Sulfadimetoksiin <i>Sulfadimethoxin</i>	50	37,0±1,2	28,2±4,0	87,0	36,0±0,7	31,0±3,8	98
	50	36,7±2,6	19,6±3,6	61,0	31,3±2,2	11,1±2,5	35
	100	32,0±1,4	15,5±3,0	48,0	31,0±2,5	10,6±2,8	33

* Taimede keskmine arv ühes nõus. / *Number of plants per vessel.***Tabel 2.** Odrataime juurte ja võrsete keskmine toorkaal (g)**Table 2.** Average wet weight of barley roots and shoots (g)

Ravim <i>Drug</i>	Konts. <i>Conc</i> mg/kg	Katse / <i>Experiment I</i>			Katse / <i>Experiment II</i>		
		juured <i>roots</i>	võrsed <i>shoots</i>	J/V suhe <i>R/S ratio</i>	juured <i>roots</i>	võrsed <i>shoots</i>	J/V suhe <i>R/S ratio</i>
Kontroll <i>Control</i>	0	0,083	0,106	0,78	0,055	0,073	0,75
Oksütetratsükliin <i>Oxytetracyclin</i>	50	0,073	0,084	0,87	0,052	0,069	0,75
Tsiprofloksatsiin <i>Ciprofloxacin</i>	100	0,055	0,090	0,61	0,060	0,074	0,81
Sulfadimetoksiin <i>Sulfadimethoxin</i>	50	0,046	0,072	0,64	0,052	0,066	0,79
	50	0,034	0,038	0,89	0,030	0,019	1,58
	100	0,035	0,033	1,06	0,033	0,016	2,06

Tabel 3. Redise juurte ja pealsete keskmine toorkaal (g)**Table 3.** Average wet weight of radish roots and tops (g)

Ravim <i>Drug</i>	Konts <i>Conc</i> mg/kg	Taimi <i>Plants</i> *	Kogukaal <i>Total weight</i>	Juured <i>Roots</i>	Pealsed <i>Tops</i>	J/P suhe <i>R/T ratio</i>
Kontroll <i>Control</i>	0	26	161,1	2,1±1,7	4,2±1,1	0,50
Oksütetratsükliin <i>Oxytetracyclin</i>	50	29	193,9	2,1±1,7	4,4±1,2	0,48
Tsiprofloksatsiin <i>Ciprofloxacin</i>	100	27	156,3	1,3±0,9	4,2±1,6	0,31
Sulfadimetoksiin <i>Sulfadimethoxin</i>	50	28	160,4	1,4±1,2	4,0±1,1	0,35
	50	15	70,8	1,0±1,6	3,6±2,5	0,28
	100	8	53,5**	0,6±0,5	2,7±0,9	0,22
			38,6	1,5±5,2	3,5±3,3	0,43
			9,6**	0,3±0,2	1,7±0,5	0,15

* Taimede üldarv pärast harvendamist. / *Total number of plants after thinning out.*** Arvestamata ühte eriti suureks kasvanud taime. / *Except one very big plant.*

Kirjandus

- Blaha T. Gesundheits- und Umweltrisiken nach Anwendung von Antiinfektiva und Antiparasitika in der Nutztierhaltung – Vermeidungsstrategien und Auswege. – Dtsch. Tierärztl. Wschr., B. 103 s. 278...284, 1996.
- Brambilla G., Casoria P., Civitareale C., Cozzolino S., Gaudio L., Migliore L. Sulphadimetoxine as environmental tracer to evaluate phytotoxicity in crop. – Proceedings of Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food – EuroResidue III – Veldhoven, 6–8 May 1996. p 292...295.
- Dojmi di Delupis G., Macri A., Civitareale C., Migliore L. Antibiotics of zootechnical use: effects of acute high and low dose contamination on *Daphnia magna* Straus. – Aquatic Toxicology, vol. 22, p. 53...60, 1992.
- Martens R., Wetzstein H.-G., Zadrazil F., Capelari M., Hoffmann P., Schmeer N. Degradation of the fluoroquinolone enrofloxacin by wood-rotting fungi. – Appl. and Environm. Microbiol., vol. 62, p. 4206...4209, 1996.
- Migliore L., Brambilla G., Cozzolino S., Gaudio L. Effect on plants of sulphadimethoxine used in intensive farming (*Panicum miliaceum*, *Pisum sativum* and *Zea mays*). – Agricult., Ecosystems and Environm., vol. 52, p. 103...110, 1995.
- Schnürer J., Rosswall T. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. – Appl. and Environm. Microbiol., vol. 43, p. 1256...1261, 1982.
- Scow K. M., Fang S., Johnson C., Ma G. M. Biodegradation of sorbed chemicals in soil. – Environm. Health Perspect., vol. 103, p. 93...95, 1995.
- Zubay G. – Biochemistry, 3rd Edn., W.C.B.Publishers, p. 570, 1993.
- Van Gool S. Mogelijke effecten van antibiotica residuen in dierlijke mest op het milieu. – Tijdschr. Diergeneeskd., vol. 118, p. 8...10, 1993.
- Wetzstein H.-G., Schmeer N., Karl W. Degradation of the fluoroquinolone enrofloxacin by the brown rot fungus *Gloeophyllum striatum*: Identification of Metabolites. – Appl. Environm. Microbiol., vol. 63, p. 4172...4281, 1997.

Effect of Some Antibacterial Veterinary Drugs on Growth of Barley and Radish

A. Aruksaar, T. Püssa, P. Kuldkepp, M. Ivask

Summary

The effect of presence in soil of 3 anti-bacterial veterinary drugs (sulfadimethoxin, ciprofloxacin and oxytetracyclin) on germination and growth of barley and radish plants was studied. The characteristics of the soil used: type – Stagnic Luvisol (FAO/ISRIC); N – 0.100%; P – 8.36 mg/100g; K – 13.0 mg/100g; Na – 1.6 mg/100g; OM (loss on ignition at 360°C) – 1.98%; pH_{KCl} – 5.97. The plants were grown in laboratory in 3 parallels (6 vessels for the control soil) consecutively in the same soil without an intermediate addition of the drug or any nutritient. The sequence of experiments was I – barley, II – barley and III – radish. The barley was harvested after 25 days, the plants were weighed, measured and severed to divide the root from shoots. Both parts were weighed separately and analyzed for N, P, K, Ca and Mg content. The radish was harvested after 65 days, the plants were weighed, divided into roots and shoots, both parts were weighed separately. A sample of soil was removed after every growing experiment and analyzed for pH_{KCl}, OM, N, P, K, Na, microbial esterase hydrolytic activity (the results not included). The main results are as follows: all antibacterial drugs depressed the growth of plants – sulfadimethoxin being by far the most potent one. It strongly inhibited the growth of both plants, in the case of radish it was already the germination that was very strongly depressed (2-5 seeds out of 30).

Ciprofloxacin caused the growth of partly whitened 'albino' plants. The effect of oxytetracyclin was the weakest. We were able to confirm the results of Italian scientists (Migliore *et al.*, 1995; Brambilla *et al.*, 1996) showing a high phytotoxicity of sulfadimethoxin. The question of the accumulation of the drugs in the plants remains open until a plant analysis for these drugs. It is planned to continue this study at lower concentrations of sulfadimethoxin as well as with other sulfonamides and antibiotics of other types both in laboratory and in field.