

# ANTIBAKTERIAALSETE VETERINAARRAVIMITE MÕJU TAIMEDE KASVULE NING RAVIMIJÄÄKIDE AKUMULEERUMINE TAIMEDES

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

Veterinaarmeditsiinis kasutatavad antibakteriaalsed ravimid võivad mulda jõudmisel põhjustada mitmesuguseid ökoloogilisi probleeme (Aruksaar *et al.*, 1998; Blaha, 1996) Paljud neist, sealhulgas sulfoonamiidid ja fluorokinoloonid, on raskesti lagundatavad. Nii on näiteks enro- ja tsiprofloksatsiine võimelised degradeerima vaid teatud seemned (Martens *et al.*, 1996). Antibakteriaalsete ainete jäägid võivad muuta mulla mikroobikooslust, mille tulemusena võivad alaneda mulla mikroobiaktiivsus, viljakus ning ka vastupanuvõime taimekaitsevahenditele ja teistele ksenobiootikumidele (Migliore *et al.*, 1995). Mulda sattunud ravimijäägid võivad pidurdada taimekasvu (Aruksaar *et al.*, 1998; Batchelder, 1982; Brambilla *et al.*, 1996; Migliore *et al.*, 1995). Veet vähelahustuvad ravimijäägid võivad sõnnikule või teistele mulla tahketele komponentidele kinnitunuina ja raskesti kättesaadavana degradeerivaile mikroorganismidele mõjustada mulda pikema aja jooksul (Martens *et al.*, 1996). Mullast võivad neid akumuleerida aga taimed, mis avab neile toiduahelat pidi tee looma ja inimese organismi (Migliore *et al.*, 1995; Brambilla *et al.*, 1996). Sulfadimetoksiini akumuleerumise odras, hirsis, maisis ning aedhernes on tõestanud rühm Itaalia teadlasi, kes on kindlaks teinud ka selle sulfoonamiidide klassi kuuluva ravimi taimekasvu pärssiva toime (Migliore *et al.*, 1995; Brambilla *et al.*, 1996).

Oleme varem näidanud (Aruksaar *et al.*, 1998), et nii sünteetilised ravimained sulfadimetoksiin (sulfoonamiidid) ja tsiprofloksatsiin (fluorokinoloonid) kui ka looduslik oksütetratsükliin (tetratsükliinid) pidurdavad toitainevaeses mullas odra (*Hordeum vulgare* L.) ning redise (*Raphanus sativus*) kasvu *in vivo* laboratoorses tingimustes. Eriti tugevat fütotoksilist toimet omas sealjuures sulfadimetoksiin, mis redisel pärssis koguni seemnete idanemist. Tsiprofloksatsiini juuresolekul mullas aga tekkis taimedel tugev alapigmentatsioon albinismiini välja. Mulla summaarne esteraasne aktiivsus kahanes sulfadimetoksiini toimel kuni kaks korda.

Käesolevas artiklis avaldame täiendava taimkatse tulemused samade antibakteriaalsete ainete juuresolekul toitainetega rikastatud kasvuturba ning toitainevaeses ja väetatud mineraalmuldades.

## Materjalid ja meetodika

**Seemned:** aeduba (*Phaseolus vulgaris* L.) 'Dwarf Bean yellow', suvinisu (*Triticum aestivum*) 'Heta', redis (*Raphanus sativus*) 'Novired'.

**Mineraalmuld.** Toitainevaene muld: Eerika IOSDV katsepõllult võetud 9 aastat väetamata näivleetunud mulla huumushorisont, mille olulisemad agrokeemilised näitajad on järgmised:  $N_{\text{üld}} - 0,1\%$ ; liikuvad P – 9,8 mg, K – 12,0 mg ja Na – 1,6 mg/100g; orgaaniline aine (550 °C) – 2,4%;  $pH_{CaCl_2} - 5,4$ . Väetatud muld saadi 200 grammile lähtemullale 32 mg nitroammofoska (17:7,5:14) lisamisel.

**Kasvuturvas:** liikuvad P – 87,6 mg ja K – 239 mg/100 g,  $pH_{CaCl_2} - 5,2$ , orgaaniline aine – 80,3%.

**Antibakteriaalsed ravimid:** sulfadimetoksiin (*sulfadimethoxinum* – Tallinna Farmaatsiatehas), tsiprofloksatsiin (*ciprofloxacinum*) (KRKA, Sloveenia); oksütetratsükliin (*oxytetracyclinum* – Interchemie Werken "De Adelaar", Holland). Kasutatud kontsentratsioonid: sulfadimetoksiin – 10 ja 50 mg/kg, tsiprofloksatsiin ja oksütetratsükliin – 50 ja 100 mg l kg mineraalmulla või kasvuturba kohta.

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

**Meetodika.** Mineraalmuld sõeluti ja jaotati 200 g kaupa plastmassnõudesse, niisutati ning väetatud variantide saamiseks lisati väetis. Kasvuturvas jaotati plastmassnõudesse 120 g kaupa ning niisutati. Seejärel külvati seemned (igasse nõusse kas 5 aedoa-, 20 nisu- või 10 rediseemet). Igat varianti tehti kolmes korduses. Peale külvi niisutati muld vastava antibakteriaalse ravimi vesilahusega. Katsenõud paigaldati kunstliku valgustuse alla (kvantvoo pindtihedus 126–171  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ; valge ja pimedaga suhe 15:9) ning mulda kasteti vastavalt vajadusele. Pärast tärkamist viidi redisetaimede arv igas nõus kaheksale. Kasvuage – aeduba 24 päeva, redis 35 päeva, nisu 40 päeva.

Katse lõpetamisel eemaldati taimed mullast, juured pesti rohke veega, mõõdeti aedoa- ja nisutaimede maapealse osa pikkused; taimed kaaluti, eraldati juured. Materjal kuivatati toatemperatuuril ning nii pealsetes kui ka juurtes määrati Tartu Veterinaar- ja Toidulaboris antibakteriaalsete ainete sisaldus mikrobioloogilise kaheplaadimeetodiga (*Bacillus subtilis*, pH 6,0 (oksütetratsükliin) ja 8,0 (tsiprofloksatsiin)). Muldades määrati pärast katse lõppu standardmeetoditega kuivaine, pH(0,01M  $\text{CaCl}_2$ ), orgaaniline aine (kaalukadu temperatuuril 550 °C), omastatavad fosfor ja kaalium, ravimijääkide sisaldus mikrobioloogilise meetodiga, mikroobimass lipiidse fosfaadi meetodiga (Frostegård *et al.*, 1991) mikroorganismide summaarset aktiivsust näitav esteraasne aktiivsus fluorestseindiatsetaadi suhtes (Schnürer, Rosswall, 1982).

## Katsetulemused ja arutelu

**Ravimite mõju taimede kasvule.** Enamikul juhtudel omasid ravimid taimekasvu pidurdavat toimet, kusjuures tugevaim oli jällegi sulfadimetoksiini mõju, olles sealjuures kõige nõrgem kasvuturbas ning tugevaim väetamata mineraalmullas.

**Taimeliikide kaupa.** Aedoa korral oli turvasmullas taimede säilivus (katse lõpul olnud taimede protsent külvatud seemnete arvust) peaaegu 100%, selge kasvupidurdus esines vaid tsiprofloksatsiini kõrgemal kontsentratsioonil (tabel 1). Väetamata mineraalmullas oli taimede säilivus (ka nullvariandil) madalam; kusjuures säilivus, taime keskmine mass ning pikkus olid eriti tugevasti alanenud sulfadimetoksiini ja oksütetratsükliini suuremal kontsentratsioonil. Tsiprofloksatsiini manusel võis täheldada aga nullvariandiga võrreldes paremat säilivust ning ka veidi suuremat ühe taime massi. Väetatud mineraalmulla korral mõjus taimekasvu pidurdavalt vaid sulfadimetoksiin suuremal kontsentratsioonil. Suurim taimede mass ja ka kõrgeim säilivus olid nüüd oksütetratsükliini väiksemal ja jällegi tsiprofloksatsiini suuremal kontsentratsioonil. Nisu korral äratas tähelepanu taimede säilivuse suur ebareeglipärane kõikumine eri variantide vahel. Nii säilis kontrollvariantides 60-st võimalikust kasvuturbas 51, mineraalmullas 27 ja väetatud mineraalmullas 37 taime, tsiprofloksatsiini suuremal sisaldusel vastavalt 39, 12 ja 38 ning sulfadimetoksiini suuremal sisaldusel vastavalt 50, 42 ja 24 taime. Nisutaimed kasvasid kõige paremini kasvuturbas, kus võis täheldada vaid sulfadimetoksiini pidurdavat mõju tema suuremal sisaldusel. Väetamata mullas oli tugev kasvupidurdus jällegi sulfadimetoksiini suuremal sisaldusel. Redise jaoks on olemas andmed vaid kasvuturba korral, sest mineraalmuldadel kasvanud taimed hävitati lehetäide poolt. Kasvuturbal kasvanud taimede säilivus oli ligikaudu 58%, sõltudes vähe variantist, pealsete kaal oli aga märgatavalt alanenud sulfadimetoksiini manusel. Kõigil juhtudel, kui taimede säilivus oli madal, kasvasid säilinud taimed aga suhteliselt suuremaks, mistõttu võrreldavate ühe taime keskmiste masside leidmiseks jagati taimede kogumass oa ja nisu korral mulda pandud seemnete arvuga ning redise korral peale harvendamist kasvama jäetud taimede arvuga.

**Ravimite mõju taimede pigmentatsioonile.** Tsiprofloksatsiini suuremal sisaldusel mullas tekkis osa taimede esimese kasvujärgu lehtedes albinism. Turvasmullas esines albinismi umbes 30%-l aedoa taimedest ja üksikutel nisutaimedel, väetamata mineraalmullas vaid ühel aedoa taimel, väetatud mineraalmullas aga 15%-l nisutaimedest. Oksütetratsükliiniga variantides esines aedoa esimese kasvujärgu lehtedes kõigil taimedel kõigis kolmes mullas ravimi mõlemal kontsentratsioonil kloroos. Nisul ega redisel kloroosi ei täheldatud. Sulfadimetoksiiniga variantides muutusi taimede pigmentatsioonis ei olnud. Alanenud pigmentatsioon võib olla põhjustatud häiretest mõne elemendi omastamisel mullast.

**Ravimite akumulatsioon taimedes.** Ravimainete akumulatsioon taimede juurtes ja maapealsetes osades hinnati mikroobikasvu inhibeerimise meetodil agari geelis. Juurte analüüsi tulemused on toodud tabelis 2. Et meetodit pole varem ei mulla ega taimse materjali analüüsiks kasutatud ning ta on standardiseerimata, ei saa toodud arvude põhjal leida ravimite täpseid kontsentratsioone uuritavates materjalides. Siiski on ilmne, et nii tsiprofloksatsiini kui ka oksütetra-tsükliini akumulatsioon taimede juurtes enamikus (tsiprofloksatsiini kõigis) analüüsitud variantides. Et üheks mikrobioloogiliseks määramiseks võetud mulla mass on ligikaudu 8 korda suurem kui analüüsiks võetud taimse materjali mass, on ravimijääkide sisaldused juurtes oluliselt kõrgemad kui vastavates muldades. Muldadele (proovi mass umbes 0,1 g) leiti järgmised inhibeerimistsooni laiused optimaalsel pH-l: tsiprofloksatsiini 100 mg/kg – 10 mm; oksütetratsükliini 50 mg/kg – 5 mm, 100 mg/kg – 7 mm.

Taimede maapealsetest osadest andsid inhibeerimistsooni, ja sealjuures küllaltki laia, tsiprofloksatsiiniga segatud kasvuturbas kasvanud redise pealsed (tsoonide läbimõõdud 13 ja 12 mm ravimi nominaalkontsentratsioonidel turbas vastavalt 50 ja 100 mg/kg). Saadud arvud on suuremad kui vastavad arvud juurte korral, mis näitab tsiprofloksatsiini kontsentreerumist redise pealsetesse. Pikema kasvuaja korral võib ravimite sisaldus taimedes veelgi suurenedada. Kasutatud meetod ei näidanud sulfadimetoksiini akumulatsioon taimedes. Et negatiivse tulemuse andis ka sulfadimetoksiiniga segatud muldade analüüs, siis võib oletada, et määramistingimused ei ole sulfoonamiidide toime jaoks optimaalsed ning analüüsi tulemuste alusel ei saa teha otsust sulfadimetoksiini akumulatsioon kohta. Kirjanduses on näidatud sulfadimetoksiini akumulatsioon taimede, sealhulgas odra maapealsetes osades (Brambilla *et al.*, 1996; Migliore *et al.*, 1995).

**Ravimite mõju mulla mikroobimassile ja aktiivsusele.** Mikroobide kogumassi hindamiseks mullas kasutatud meetod näitas mikroobide arvukuse suhteliselt väikest (kuni 20%-list) alanemist antibakteriaalsete ainete manusel mullas.

Ravimite mõju mulla mikroobiaktiivsusele, mille mõõduks oli võetud esteraasne aktiivsus, oli samuti väike. Küll aga on tähelepanuväärsed järgmised tulemused. 1. Turvasmullas mõõdetud aktiivsused, arvatuna grammile kuivale mullale, sõltusid analüüsiks võetud mulla massist, kusjuures proovi hulga alanemisel näiline aktiivsus kasvas. Ilmselt seonduks osa ensümaatilise hüdrolyüsi protsessis tekkivast värvainest turba orgaanilise komponendiga, jäädes nii kõrvale spektro-fotomeetrilisest kontsentratsiooni mõõtmisest. Sellele viitab ka aktiivsuse väärtuste korreleeruvus kuivaine sisaldusega kasvuturbas. Seega pole antud meetod ilma täiendavate uuringuteta suure orgaanilise aine sisaldusega muldade korral kasutatav. 2. Väetatud mineraalmullas oli aktiivsus taimede kasvatamise järel umbes 10% madalam kui vastavas väetamata mullas. 3. Esteraasne aktiivsus sõltus mõnevõrra

mullas kasvanud taimest – kõrgeim oli see näitaja aedoa järel, järgnesid nisu ja redis. Nii moodustas väetamata mullas redise järel esteraasne aktiivsus umbes 70% aktiivsusest aedoa järel, väetamata mullas ja kasvuturbas aga umbes 80%. 4. Absoluutselt kõrgeimad mikroobiaktiivsuse väärtused saadi mineraalmuldadest variantides, kuhu peale aedoa külvamist oli lisatud tsiprofloksatsiini.

**Ravimite mõju mulla parameetritele.** Omastatavate fosfori ja kaaliumi ning orgaanilise aine sisaldused kasvasid katse jooksul peaaegu kõigis variantides. Kõige rohkem suurenesid need näitajad aedoa korral. Aedoaga mineraalmuldades ilmnes positiivne korrelatsioon mikroobiaktiivsuse ja kaaliumisisalduse kasvu vahel katse ajal. Kaaliumi kontsentratsioon ja orgaanilise aine sisaldus kasvasid kõige rohkem tsiprofloksatsiiniga variandis väetamata mineraalmullas. Kui siinkohal veel kord viidata aedoa kasvu mõningasele suurenemisele tsiprofloksatsiini manulusel, jääb mulje, et nimetatud ravim toimis, seda küll vaid liblikõielise aedoa juuresolekul, mulla agrokeemilisi näitajaid parandava ainena. Kas antud juhul on tegemist ravimaine poolt mulla mikroobikoosluse struktuurile avaldatava mõjuga, mikroobide ja seente tasakaalu nihutamisega või mingi muu efektiga, vajab uurimist. Nisu puhul tsiprofloksatsiini positiivseid mõjusid ei ilmnenu.

**Tabel 1.** Aedoa taime keskmine märgmass (g)

**Table 1.** Average wet mass of bean plants (g)

| Mulla tüüp/Soil type               | Kontroll<br>Control | Tsipro50<br>Cipro50 | Tsipro100<br>Cipro100 | Sulfa10<br>Sulfa10 | Sulfa50<br>Sulfa50 | Oksü50<br>Oxy50 | Oksü100<br>Oxy100 |
|------------------------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|-----------------|-------------------|
| Väetamata min.-muld/Mineral soil   | 2,22                | 2,02                | 2,59                  | 2,37               | 1,37               | 2,65            | 1,82              |
| Väetatud min.-muld/Fertil.min.soil | 2,65                | 2,62                | 2,69                  | 2,47               | 1,77               | 2,17            | 2,32              |
| Kasvuturvas/Horticultural peat     | 2,36                | 2,50                | 1,88                  | 2,51               | 2,59               | 2,58            | 2,33              |

**Tabel 2.** Antibakteriaalsete ainete taimejuurtes akumulatsioonide tõestamise mikrobioloogilise katse tulemused

**Table 2.** Results of testing of the accumulation of the antibacterial substances in the plant roots by the microbiological two-plate method.

| Ravim/Drug                               | Aeduba/Kidney Bean |    |     | Nisu/Wheat |    |     | Redis<br>Radish<br>I |
|--|--------------------|----|-----|------------|----|-----|----------------------|
|  | I                  | II | III | I          | II | III |                      |
| tsiprofloksatsiin/ciprofloxacin 50 mg/kg | 0                  | 8  | 6   | 5          | 0  | 7   | 6                    |
| tsiprofloksatsiin/ciprofloxacin 100 "    | 7                  | 10 | 7   | 7          | 11 | 7   | 11                   |
| oksütetratsükliin/oxytetracycline 50 "   | 5                  | 4  | 3   | 6          | 0  | 4   | 7                    |
| oksütetratsükliin/oxytetracycline 100"   | 7                  | ND | ND  | 10         | 0  | 6   | 7                    |

Numbrid tabelis 2 tähistavad mikroobikasvu pidurduspiirkonna läbimõõtu millimeetrites söötmele asetatud proovi (umbes 0,015 g) ümber suurema inhibeerimise andnud pH-l. / Numbers in the table are marking the diameter in millimeters of the inhibition zone around the sample (about 0.015 g ) on the agar gel medium of the optimal pH (pH=6,0 for oxytetracycline and 8,0 for ciprofloxacin).

Mulla tüübid/Soil types: I – turvas/peat; II – mineraalmuld/mineral soil; III – väetatud mineraalmuld/mineral soil with fertilizer; ND – mitte määratud/not determined.

## Kokkuvõte

Uuritud antibakteriaalsed ained, eriti sulfadimetoksiin, pidurdasid enamikul juhtudel taimede kasvu ning tekitasid osas variantides taimedel alanenud pigmentatsiooni. Ravimainete mõju mulla mikroobimassile ja -aktiivsusele oli väike. Huvitavad efektid (kaaliumi ja orgaanilise aine sisalduse suurenemine ning taimekasvu kiirendamine mineraalmullas) ilmnemisele aga tsiprofloksatsiini manulusel aedoa korral. Kõigi taimede juured akumulatsioonid tsiprofloksatsiini ja oksütetratsükliini, tsiprofloksatsiini kontsentratsioon ka redise pealsetes.

## Kirjandus

- Aruksaar A., Püssa T., Kuldkepp P., Ivask M. Mõningate antibakteriaalsete veterinaaravimite mõju odra ja redise kasvule./Effect of some antibacterial veterinary drugs on growth of barley and radish. – Akadeemilise Põllumajanduse Seltsi Toimetised/Transactions of the Estonian Academic Agricultural Society, 6, lk. 7...10, 1998.
- Batchelder A. R. Chlorotetracycline and oxytetracycline effects on plant growth and development in soil systems. – J. Environ. Qual., vol.11 (4). pp. 675...678, 1982.
- 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, pp. 292...295.
- Frostegård Å., Tunlid A., Bååth E. Microbial biomass measured as total lipid phosphate in soils of different organic content. – J. Microbiol. Methods, vol. 14, pp. 151...163, 1991.
- 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, pp. 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*). – Agric. Ecosyst. Environ., vol. 52, pp. 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, pp. 1256...1261, 1982.

### **Effect of Antibacterial Veterinary Drugs on Growth of Kidney Bean, Barley and Radish and Their Accumulation in Plants**

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

#### Summary

The effect of presence in soil of 3 anti-bacterial veterinary drugs (sulfadimethoxin, ciprofloxacin and oxytetracycline – two different concentrations of each) on growth of three plants in three different soils was studied. 1. Mineral nutrient-poor soil – Stagnic Luvisol (FAO/ISRIC); N – 0.1%; P – 9.8 mg/100g; K – 12.0 mg/100g; Na – 1.6 mg/100g; OM (loss on ignition at 550°C) – 2.4%; pH<sub>CaCl2</sub> – 5.4. 2. Mineral soil with fertilizer (32 mg of nitroammofoska (17:7.5:14) per 200 g of soil); 3. Horticultural peat: P – 87,6 mg/100g; K – 239 mg/100g, pH<sub>CaCl2</sub> – 5.2, OM – 80,3%. The plants were grown in laboratory in 3 parallels (6 vessels with a control soil). Bean was harvested after 24 , radish after 35 and wheat after 40 days. Plants were weighed, measured and severed to divide the root from shoots. Both parts were weighed separately and analyzed for content of respective drug residue by accommodated microbiological two-plate method. Soil samples were taken after growing experiment and analyzed for pH<sub>CaCl2</sub>, OM, P, K, drug residue content, total lipid phosphate and esterase activity. The main results are as follows: in most cases the antibacterial drug depressed the growth of plants – sulfadimethoxin being the most potent one. In case of kidney bean ciprofloxacin showed several interesting effects: 1. The total weight as well as the average wet weight of one plant were somewhat higher than in the control soil (see Table 1); 2. The raise of microbial esterase activity, soluble P and K concentrations as well as the content of organic matter were highest in the presence of ciprofloxacin. In case of bean the esterase activities have positive correlation with the potassium concentration in the soil. Ciprofloxacin caused development of albinosis in the older parts of bean and wheat plants and oxytetracycline development of chlorosis in the older parts of bean plants. The effect of antibacterial drugs on the total microbial mass was low. The non-standardized microbiological test revealed accumulation of ciprofloxacin in the roots of all plants studied and tetracyclin in part of cases (see Table 2). Ciprofloxacin was found also in the shoots of radish grown on peat, with the inhibition zone width 13 and 12 mm in case of drug nominal concentrations in soil of 50 and 100 mg/kg, respectively. These numbers are slightly higher than the zone widths in case of radish roots. The conditions used for microbiological test were obviously non-optimal for sulfadimethoxin, which was not discovered even in the soil supplemented with the drug.