

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

**A gazdasági haszonállatok tömegkezelésére használt
doxiciklin egyes környezettoxikológiai jellemzőinek
vizsgálata**

PhD értekezés

Dr. Szatmári István

2012

Témavezető és témabizottsági tagok:

Dr. Laczay Péter
Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Kar
Élelmiszer-higiéniai Tanszék
témavezető

Dr. Lehel József
Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Kar
Gyógyszertani és Méregtani Tanszék
témabizottság tagja

Dr. Sályi Gábor
Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság (korábban: Országos Állategészségügyi
Intézet)
témabizottság tagja

Készült 8 példányban. Ez asz. példány.

.....

dr. Szatmári István

Tartalom

Rövidítések	6
1. Összefoglalás.....	7
2. Summary.....	9
3. Bevezetés	11
4. Irodalmi áttekintés	14
4.1. Az egyes állatgyógyászati készítmények felhasználásának mértéke	14
4.2. A hatóanyag kiürülésének mértéke a kezelést követően.....	15
4.3. A környezetbe való kijutás módja.....	16
4.4. Trágyaérelés.....	17
4.5. Viselkedés a környezetben	19
4.6. Milyen készítmények környezeti jelenlétével lehet számolni?	22
4.7. Milyen hatások jelentkezhetnek?	25
4.8. Doxiciklin jellemzése.....	28
4.8.1. Általános jellemzés	28
4.8.2. Hatásmechanizmus	29
4.8.3 Farmakokinetika.....	30
4.8.4 Toxicitás, mellékhatások	31
4.8.5 Tetraciklinek és a környezet	32
5. Anyagok és módszerek leírása.....	33
5.1. Doxiciklin lebomlása sertéstrágyában	33
5.1.1. In vitro trágyaérelés.....	33
5.1.2. Trágyaérelés telepi körülmények között	34
5.1.3. Doxiciklin kimutatása trágyamintákból.....	35
5.1.4. Doxiciklin koncentrációjának meghatározása	36
5.1.5. A módszer validálása	37

5.1.6. A felezési idő meghatározása	40
5.2. Doxiciklin lebomlása talajban	42
5.2.1. Kísérleti elrendezés	42
5.2.2. Laboratóriumi analízis	44
5.2.3. Felhasznált vegyszerek és eszközök	44
5.2.4. Mintaelőkészítés	45
5.2.5. Validálás	46
5.3. Nitrogén transzformációs vizsgálat	48
5.3.1. Kísérleti elrendezés	48
5.3.2. Felhasznált anyagok és eszközök.....	49
5.3.3. A redukciós lépés előkészítése	50
5.4. Antibiotikumok talajlakó mikroorganizmusokra kifejtett hatásainak vizsgálata a redoxpotenciál-változás mérésén keresztül	53
5.4.1. Talaj és antibiotikumok.....	53
5.4.2. A minták előkészítése	55
5.4.3. Redoxpotenciál-mérésen alapuló módszer - A mérőrendszer leírása.....	56
6. Eredmények	59
6.1. Doxiciklin lebomlása sertéstrágyában	59
6.1.1. In vitro trágyaérelés.....	59
6.1.2. Trágyaérelés telepi körülmények között	60
6.2. Doxiciklin lebomlása mezőgazdasági talajban	62
6.3. Nitrogén transzformációs vizsgálat	64
6.4. Antibiotikumok talajlakó mikroorganizmusokra kifejtett hatásainak vizsgálata a redoxpotenciál-változás mérésén keresztül	67
7. Megbeszélés – Következtetések	79
7.1. Doxiciklin lebomlása sertéstrágyában	79
7.2. Doxiciklin lebomlása mezőgazdasági talajban	82
7.3. Nitrogén transzformációs vizsgálat	84

7.4. Antibiotikumok talajlakó mikroorganizmusokra kifejtett hatásainak vizsgálata a redoxpotenciál-változás mérésén keresztül	86
8. Új tudományos eredmények	90
9. Irodalom	91
10. Saját publikációk	99
11. Mellékletek	101
11.1. Az eredmények statisztikai értékelése	107
Köszönetnyilvánítás	111

Rövidítések

Rövidítés	Magyarázat
CVMP	Állatgyógyászati Készítmények Bizottság (Committee for Veterinary Medicinal Products)
EMA (EMEA)	Európai Gyógyszerügynökség (European Medicines Agency)
ADI	Elfogadható napi bevitel (Acceptable Daily Intake)
ERA	Környezeti kockázatbecslés (Environmental Risk Assessment)
ISO	Nemzetközi Szabványügyi Testület (International Organization for Standardization)
K_d	Megoszlási együttható (distribution coefficient)
DT_{50}	Felezési idő: az az időtartam, amely alatt a vizsgálandó anyag koncentrációja a felére csökken
EC_{50}	Egy anyag azon koncentrációja, melyhez 50%-os hatáserősség tartozik
CRD	Idült légzőszervi betegség (Chronic respiratory disease)
LC	Folyadékkromatográfia (Liquid chromatography)
HPLC	Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (High Pressure Liquid Chromatography)
CTC	Klórtetraciklin (chlortetracycline)
OTC	Oxitetraciklin (oxytetracycline)
SPE	Szilárd fázisú extrakció (Solid phase extraction)
CRS	Chemical Reference Standards
ACN	Acetonitril
MeOH	Metanol
ACS	American Chemical Society
LOD = DL	Kimutatási határ (detection limit, limit of detection)
LOQ = QL	Meghatározási határ (a mennyiségi mérés alsó határa, quantitation limit, limit of quantitation)
FVM	Földművelésügyi és Vidékfejlesztési Minisztérium
MIC	Minimális gátló koncentráció (minimum inhibitory concentration)
SD	Szórás (standard deviation)
CV	Variációs koefficiens (coefficient variation)
USDA	United States Department of Agriculture (Egyesült Államok földművelésügyi minisztériuma)

1. Összefoglalás

Az állatgyógyászati szerek alkalmazásának alapfeltétele a megfelelő hatékonyság és ártalmatlanság. Ez utóbbi hagyományosan a kezelt állat (célállat), valamint a kezelést végző, továbbá a kezelt állat húsát és egyéb ehető termékeit fogyasztó ember biztonságát jelentette. A közelmúltban az ártalmatlanság követelménye egy újabb területtel bővült, amely a hatóanyagoknak a környezetre, annak élővilágára gyakorolt hatását foglalja magába. Ez különösen fontos a tömegkezelésre használt gyógyszerkészítmények, így például a tetraciklinek esetében.

Vizsgálatainkban egy állatgyógyászati felhasználását tekintve viszonylag újabb tetraciklin-származék, a doxiciklin sorsát követtük végig a kezelt állatokból történő kiürülését követően a trágyában, majd pedig a trágyával kezelt talajban, és tanulmányoztuk a talaj élővilágára kifejtett hatásait. Vizsgálataink első fázisában a sertések szervezetéből kiürült antibiotikum lebomlásának mértékét vizsgáltuk a trágyában *in vitro* és telepi körülmények között. A több hetes trágyaérlelési időszak alatt gyűjtött minták kromatográfiás analízise alapján megállapítottuk, hogy a környezet hatásaitól függően a doxiciklin felezési ideje laboratóriumi körülmények között 52,5 nap, míg a gyakorlati körülmények végzett trágyaérlelés körülményei között 25,7 nap. A laboratóriumi vizsgálatban, még 16 hét érlelés után is 20,36 mg/kg koncentrációban volt kimutatható a doxiciklin. A telepen végzett kísérletben a vizsgált antibiotikumot 12 hét után 9,37 mg/kg koncentrációban tudtuk kimutatni a trágyából.

A továbbiakban a telepi körülmények között érlelt doxiciklin tartalmú trágyát egy adott mezőgazdasági földterület trágyázására használtuk fel, hogy tovább követve az antibiotikum sorsát meghatározzuk a vegyület lebomlásának mértékét a talajban. A 20 hetes időszak során három talajmélységből gyűjtöttünk talajmintákat, a talaj felszínéről, 20-25 cm-es és 45-50 cm-es mélységből. A viszonylag hosszú mintavételi időszak legvégén is kimutatható volt a doxiciklin minden talajrétegben 0,06, illetve 0,03 mg/kg koncentrációban. A felezési idő a talaj felszínén 66,5 nap, a 20-25 cm-es mélységben 76,3 nap, míg a 45-50-cm-es talajmélységben 59,4 nap értéknek bizonyult.

Az antibiotikum különböző környezeti feltételek közötti lebomlásának vizsgálata mellett tanulmányoztuk annak a talajban lakó mikroorganizmusok egyes életfolyamataira gyakorolt hatását is. Ennek során vizsgáltuk, hogy az antibiotikum befolyásolja-e a talajlakó mikrobák nitrogén transzformációs tevékenységét. A mért nitrát koncentrációk alapján megállapítható, hogy a doxiciklin átmenetileg gátolta a mikroorganizmusok nitrogén transzformációját. A gátlás mértéke ugyanakkor nem érte el a vonatkozó szakmai irányelv által szignifikánsnak

tekintett nagyságrendet. Egy további kísérletsorozatban a doxiciklin és további két antimikrobiális szer hatását vizsgáltuk a talaj egyes mikroorganizmusainak anyagcsere-aktivitását tükröző redoxpotenciál alakulására. Megállapítottuk, hogy a doxiciklin, az enrofloxacin és a linkomicin a talajban potenciálisan előforduló koncentrációban növeli a detektációs időt, ami az energiatermelő anyagcsere-folyamatok gátlására utal. Ugyanakkor azt tapasztaltuk, hogy a kiváltott hatás erőssége függ a talaj típusától is.

Vizsgálataink eredményei arra utalnak, hogy a doxiciklin terápiás dózisban és ideig történő alkalmazását követően jelentős koncentrációban jelenik meg a sertéstrágyában. Koncentrációja a trágyaérlelés során számottevően csökken, felezési ideje különböző körülmények között történő érlelés során 25,7 és 52,5 nap között változik és a trágyaérlelést követően 20,4 mg/kg, illetve 9,37 mg/kg koncentrációban juthat az érlelt trágyával a mezőgazdasági területre. A talaj felszínén és annak különböző mélységeiben a talajba kerülő antibiotikum koncentrációja az idő előrehaladtával csökken. Ennek mértéke a talaj különböző mélységeiben 59,4 nap és 76,3 nap közötti felezési idővel jellemezhető, de az antibiotikumot a trágya kijuttatása után 20 héttel is még 0,03-0,06 mg/kg koncentrációban tudtuk kimutatni a talaj különböző rétegeiből. Az antibiotikum a talajba jutó koncentrációban átmenetileg gátolja a talajban élő mikroorganizmusok egyes életfolyamatait, így a nitrogén transzformációs tevékenységüket és energiatermelő anyagcsere-folyamataikat.

2. Summary

Investigations on some ecotoxicological features of doxycycline used for mass treatment of production animals

The elementary condition of the usage of veterinary pharmaceuticals is the appropriate efficacy and the innocuity. The harmlessness traditionally has meant the safety of the treated (target) animal, as well as of the person treating the animals and the consumer of meat and meat products. Recently, the requirement of harmlessness has been widened with one area, which comprises the effect of the active substance on the environment and its fauna. It is very important especially in case of pharmaceuticals used for mass treatment, like tetracyclines.

In our experiments the fate of a tetracycline derivate, doxycycline was examined after its elimination from the animal. The aim was to assess the potential environmental persistence, the risk and the ecotoxicological significance of doxycycline.

In the first phase of the study the fate of the excreted antibiotic in the manure of pigs was examined in an *in vitro* and in a field study. By analysing of taken samples during the several weeks composting period the half-life of doxycycline in the laboratory study was 52,5 days and in the study done at the farm was 25,7 days, respectively. In the study under laboratory conditions after 16 weeks ageing period 20,36 mg/kg, and in the field study after 12 weeks composting 9,37 mg/kg doxycycline could be detected in manure samples.

Henceforward, the manure composted on the farm was spread onto agricultural land to follow up the fate of doxycycline and to determine the degradation rate of the antibiotic in soil. During the 20-week sampling period the samples were collected from three different soil layers surface, 20-25 cm and 45-50 cm depths. At the end of the quite long sampling period, doxyciklin can be detected in every soil depths in concentrations of 0,06 and 0,03 mg/kg. The half life of the antibiotic was proved to be 66,5 days on the surface, 76,3 days in the 20-25 cm depth and 59,4 days in the 45-50 cm depth of the soil.

Beside the examination of the degradation of the antibiotic in different environmental circumstances the effect on the microorganisms of the soil was also studied. In the course of this experiment the influence on the nitrogen transformation process of the soil microorganism was examined. Based on the measured nitrate concentrations, it can be stated that doxycycline can temporarily inhibit the nitrogen transformation activity. The rate of inhibition was not significant if we consider relevant scientific guidelines. In a further study

the effect of doxycycline and two other antimicrobial agents was examined on the metabolism of soil microorganisms by measuring the change of redoxpotential. It was found that doxycycline, enrofloxacin and lincomycine in an environmentally relevant concentration enhanced the time to detection, which indicate the inhibition of metabolism. The intensity of the effect was influenced by the type of the soils.

The results of the study indicate that the concentration of doxycycline, administered in therapeutic dosage, is significant in the manure of the pigs. The concentration of the antibiotic considerably decreased during composting with a half-life of 52,5 days and 25,7 days, respectively, but still in concentrations of 20,4 mg/kg and 9,37 mg/kg were spread onto the arable land. On the surface of the soil and in different soil depths the concentration of the doxycycline decreased with half-lives of 66,5 days, 76,3 days and 59,4 days, but even 20 weeks after fertilization it could be detected in concentrations of 0,03-0,06 mg/kg in different soil depths. The antibiotic temporarily inhibits certain life-processes of soil microorganisms, e.g. nitrogen transformation and energy metabolism.

3. Bevezetés

A környezetvédelem napjainkra a korábbiaknál sokkal összetettebb kérdéssé vált. A hulladékkezelés mellett például előtérbe került a hulladék újrahasznosítása és a kibocsátás mérséklése mellett, annak teljes megszüntetése („zéró kibocsátás”), illetve a már terhelt környezet rehabilitációja is. Mindennapi életünk során közel 100 000 vegyi anyagot használunk, amelyek veszélyeztethetik a környezetet azáltal, hogy toxikusak lehetnek a növényekre, az állatokra, az emberekre és az egész ökoszisztémára. Ezért az iparilag legfejlettebb országokban átfogó környezetvédelmi rendelkezéseket vezettek be, hogy szabályozzák a különböző szennyező források széles körét. Világméretben nézve dollár trilliókat költenek a szennyezés csökkentésére, de ennek ellenére újabb és újabb problémák merülnek fel.

A 20. században használatba vett kemikáliákat gyakorlatilag anélkül kezdték alkalmazni, hogy a környezetre, illetve közvetve, vagy közvetlenül az emberre kifejtett hatásait ismerték volna. Az 1970-es évek végétől az Európai Közösség elkezdte rendszerezni ezeket az anyagokat és az 1980-as évektől kötelezővé tette az újonnan bevezetésre kerülő kémiai anyagok környezeti kockázatbecslésének (Environmental Risk Assessment – ERA) elvégzését. A már korábban bevezetett vegyi anyagok vizsgálata is elkezdődött, de ez viszonylag lassan zajlik. Az Európai Unió téma iránti elkötelezettségét mutatja az Európai Parlament és az Európai Tanács által 2006-ben elfogadott un. REACH rendelet (a vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról, the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals – REACH), amely előírja az EU-ban használt vegyi anyagokkal kapcsolatos információk összegyűjtését és rendszerezését. A rendelet rendelkezései 2008. június 1-től vannak hatályban. A rendeletben foglaltak teljesítése esetén 2018-ra átfogóbb és mélyebb ismeretekkel fogunk rendelkezni az Európában forgalmazott vegyszerekre vonatkozóan, amely nagy segítséget jelent az emberi egészség megóvásában és a környezet védelmében.

A kötelező környezeti kockázatbecslés kezdetben nem vonatkozott a gyógyszerekre, jóllehet a gyógyszerek éppen olyan tulajdonságokkal rendelkeznek (biológiailag aktívak, vízdékonyságuk miatt mobilisak, nem könnyen bomlanak le biológiailag), amelyek alapján joggal feltételezhető a környezetre kifejtett hatásuk. Ma már az ilyen jellegű vizsgálatok kötelezőek az újonnan engedélyezésre kerülő állatgyógyászati készítmények esetében is, és remélhető, hogy a közeljövőben a lehetséges környezeti kockázat meghatározása a humán orvoslásban használt gyógyszerekre is kötelező lesz.

Jelenleg közel 4000 gyógyászatban használt vegyületet ismerünk a humán és állatorvosi terápiában (Roig, 2010). Az állatgyógyászati szerek alkalmazásának alapfeltétele a megfelelő hatékonyság és ártalmatlanság. Ez utóbbi hagyományosan a kezelt állat (célállat), valamint a kezelést végző, továbbá a kezelt állat húsát és egyéb ehető termékeit fogyasztó ember biztonságát jelentette. A közelmúltban az ártalmatlanság követelménye egy újabb területtel bővült, amely a hatóanyagoknak a környezetre, annak élővilágára gyakorolt hatását foglalja magába. Az állatgyógyászati készítmények törzskönyvezése során azok környezetoxikológiai értékelését először 1980-ban, az Egyesült Államokban vezették be. Az Európai Unió pedig a 92/18/EK irányelvvel, 1992-től iktatta be jogrendjébe. Azóta a forgalomba hozatali engedélyezés egyik feltétele a készítményre, illetve hatóanyagára vonatkozó megfelelő ökotoxikológiai adatok és értékelés benyújtása. A vonatkozó jogi szabályozás szerint a környezetoxikológiai értékelést két fázisban kell végezni; az első fázis célja az adott hatóanyagra vonatkozó környezeti terhelés mértékének meghatározása, a második fázisban pedig a gyógyszer sorsát és hatásait kell megítélni. A jogszabály végrehajtására az EU illetékes bizottsága (Állatgyógyászati Készítmények Bizottsága; Committee for Veterinary Medicinal Products - CVMP) 1997-ben bocsátotta ki az első útmutatókat, amelyek az ipar, illetve a hatóságok számára iránymutatásként szolgáltak a környezetoxikológiai értékelések elvégzésekor.

Az előbbieken említett útmutatókat 2000-től az Európai Unió, az USA és Japán által is elfogadott, egységesített irányelvek váltották fel, előbb az értékelés első fázisára vonatkozóan (CVMP/VICH/592/98) (CVMP, 2000), majd 2004-től a hatóanyagok sorsának és hatásainak részletesebb elemzése tekintetében (CVMP/VICH/790/03) (CVMP, 2003). A közelmúltban pedig egy újabb, az előbbi útmutatók végrehajtását elősegítő irányelv is megjelent, amely a jogszabályi változásoknak – 2004/28/EK irányelvvel módosított 2001/82/EK direktívának, illetve a 726/2004/EK rendeletnek – megfelelően pontosítja a környezetoxikológiai értékelés szempontjait (EMEA/CVMP/ERA/418282/2005; VICH, 2006). Ez utóbbit 2008-ban felülvizsgálták, így 2009. március 1-től már ez az újabb útmutató (guideline) van érvényben: EMEA/CVMP/ERA/418282/2005-Rev. 1 (CVMP, 2008).

Magyarországon a 2001/82/EK irányelvet a 36/2002 (IV. 29.) FVM rendelettel léptették hatályba. Ez a jogszabály azóta hatályát veszítette (88/2004 (V. 15.), 50/2006 (VI. 28.)) és jelenleg a 128/2009 (X. 6.) FVM rendelet van érvényben. A környezeti toxicitás értékelésének főbb szempontjait a rendelet 2. melléklete tartalmazza. Ennek értelmében a környezetoxikológiai megítélést (a vonatkozó EU jogszabállyal összhangban) két fázisra bontva kell elvégezni, az első a környezeti expozíció felmérését szolgálja, a második pedig –

amennyiben azt az adott szer környezetbe kerülésének mértéke indokolja – a környezetben való sorsának és a szárazföldi és vízi élőlényekre gyakorolt hatásainak értékelését célozza.

Az állatgyógyászati készítmények értékelésével kapcsolatban is jogos elvárás tehát, hogy a használatukból eredő környezeti kockázatot a lehető legalacsonyabb szintre csökkentsük, vagy amennyiben lehetséges teljes egészében megszüntessük azt. Ezt a fajta kockázatot, valamint annak mértékét vagy hiányát igazolni kell. Ennek igazolására szükséges egy-egy készítmény hatóanyaga esetében meghatározni a lebomlásának mértékét, kinetikáját, sorsát különböző közegekben (trágya, iszap, üledék, talaj, víz, stb.). Továbbá meg kell vizsgálni a lehetséges ökotoxikológiai hatásait a növényekre, állatokra, a talajban és a vizekben élő alacsonyabb rendű élőlényekre, amelyek az ökoszisztéma egy-egy részét jelentik.

Az állatgyógyászati készítmények közül a tetraciklinek, felhasználásuk mértéke alapján is, az ökotoxikológiai vizsgálatok szempontjából az egyik legfontosabb vegyületcsoportot jelentik. A tetraciklinek csoportja több, egymástól fizikai-kémiai, illetve biológiai hatásaikban is részben különböző vegyületből áll. Az úgynevezett hagyományos tetraciklinek közé soroljuk az oxitetraciklint, a klórtetraciklint és a tetraciklint, míg az előbbiekhöz képest „újabb” tetraciklin-származékoknak minősülnek a doxiciklin és a minociklin. Az állatgyógyászatban hosszú időn keresztül szinte kizárólag a hagyományos tetraciklineket használták. Így nem meglepő, hogy a tetraciklinek közül ezekre a vegyületekre vonatkozóan állnak rendelkezésre elsősorban környezettoxikológiai adatok. Az „újabb” származékok közül a doxiciklin az elmúlt évtizedben került az állatgyógyászati felhasználás előterébe, és ma a tömegkezelésre használt tetraciklinek egyre nagyobb részét adja.

A doxiciklin a hagyományos tetraciklineknél lipofilebb tulajdonságú, az állati szervezetben az előbbieknél lényegesen jobban szívódik fel és mikrobaellenes hatása is többnyire kifejezettebb (Semjén és Laczay, 1998). A doxiciklin környezetben való viselkedéséről, a trágyában és a talajban való lebomlásának mértékéről, valamint a talaj mikroflórájára gyakorolt hatásairól ugyanakkor alig rendelkezünk információval (Kümmerer, 2004).

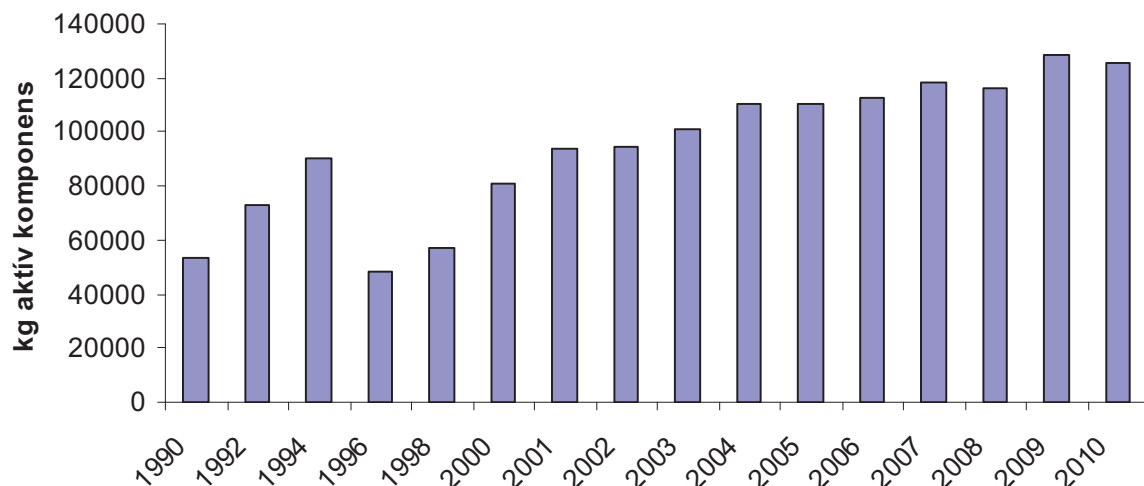
Az értekezésben bemutatásra kerülő vizsgálataink során ezért a doxiciklin lebomlásának mértékét vizsgáltuk különböző körülmények között sertés trágyában, választ keresve arra a kérdésre, hogy számolhatunk-e a doxiciklin jelenlétével a mezőgazdasági földterületek trágyázása során, ha az adott állományt az antibiotikumot tartalmazó készítménnyel kezelték. Ezután tovább követtük a doxiciklin tartalmú trágya sorsát, és vizsgáltuk a talajban való lebomlását. További kísérleteinkben pedig azt kívántuk meghatározni, hogy a doxiciklinnek van-e hatása a talajban lakó egyes mikroorganizmusok életműködésére, azok anyagcsere-aktivitására.

4. Irodalmi áttekintés

4.1. Az egyes állatgyógyászati készítmények felhasználásának mértéke

Gazdasági haszonállatok kezelésére mikrobaellenes készítményeket használnak fel a legnagyobb mennyiségben. Ezeket követik a coccidiumellenes szerek, a juhrühösség elleni fűrösztőszerek, féreghajtók, gombaellenes készítmények, gyulladáscsökkentők. A felsorolt állatgyógyászati készítmények mellett, felhasznált mennyiségükből adódóan, ökotoxikológiai jelentőségük más anyagoknak is lehet, pl. fertőtlenítőknek, szteroidoknak és egyéb hormonoknak, diuretikumoknak, szív- és érrendszerre ható készítményeknek (Benbrook, 2002, Boxall et al., 2003a, Boxall et al., 2003b, Kümmerer, 2004, Mellon et al., 2001).

Az egyes hatóanyagok felhasznált mennyiségéről viszonylag kevés adat áll rendelkezésre. Az antibiotikum-felhasználás mértékét ugyanakkor évente rendszeresen közzéteszik, például Dániában (1. ábra). Mint az ábrából látható, a 90-es évek közepén a hozamfokozók betiltását követően tapasztalható visszaesés után, az állatok kezelésére felhasznált antibiotikumok mennyisége több, mint a kétszeresére nőtt jelentősen fokozva ez által a potenciális környezetterhelés mértékét is (Jensen – Hammerum, 2009, Korsgaard – Hammerum, 2010).



1. ábra Antibiotikum felhasználás élelmiszertermelő állatok kezelésére, Dániában (Jensen – Hammerum, 2009, Korsgaard – Hammerum, 2010)

4.2. A hatóanyag kiürülésének mértéke a kezelést követően

A gyógyszerhatóanyagok testidegen vegyületek, ezeket a szervezet nem építi be saját alkotóelemeibe, nem hasznosítja energiatermelésre, azoktól igyekszik mielőbb „megszabadulni”, azokat kiválasztani. Ennek mértékét és idejét alapvetően a gyógyszermolekulák fizikai-kémiai tulajdonságai és, ezzel összefüggésben, a biotranszformáció lehetőségei és jellemzői határozzák meg.

Az állatgyógyászati készítmények alkalmazását követően a környezetbe jutó hatóanyagok minősége és mennyisége elsősorban a hatóanyag típusától, az alkalmazott dózistól, a kezelt állat fajától, a kezelési módtól, a tartási módtól és a metabolizáció mértékétől függ. A szervezetbe juttatott állatgyógyászati készítmények rövidebb-hosszabb idő után kiürülnek. Az injekció formájában alkalmazott készítmények egy része a beadás helyén maradhat, a szájon át beadott készítmények esetében a felszívódás mértéke változó lehet. A felszívódott anyagok az úgynevezett I. fázisú, illetve II. fázisú reakciók révén metabolizálódhatnak, amelynek eredményeként a képződött poláros metabolitok kiürülnek a szervezetből, de előfordulhat, hogy az eredeti anyamolekula számottevő biotranszformáció nélkül ürül ki a szervezetből (Boxall, 2003a, Kümmerer, 2004). A metabolit, az állati szervezetben történő átalakulás során, az anyamolekulától eltérő hatásra is szert tehet, vagy akár mérgező bomlástermékké is alakulhat. A metabolitok aktívak is maradhatnak, néha még nagyobb mértékben, mint az eredeti molekula (Sarmah et al., 2006). Az állatok bélsara és vizelete az anyamolekula és a metabolitok keverékét tartalmazhatja (Boxall, 2003a, Kümmerer, 2004,).

Számos, az élelmiszertermelő állatok kezelésére használt antibiotikum felszívódása a gyomor-bél csatornából kifokú, és az anyamolekula jelentős hányada közvetlenül kiürül a szervezetből (1. táblázat). Juhok oxitetraciklinnel történő kezelését követően az anyamolekula közel 21%-a, míg fiatal bikák klórtetraciklin tartalmú készítménnyel történt kezelése után, 17–75%-a ürült ki a szervezetből változatlan formában (Sarmah et al., 2006).

1. táblázat Néhány állatgyógyászatban használatos hatóanyag lebomlásának mértéke az állatokban (Kümmerer, 2004)

Gyógyszercsoport	Lebomlás mértéke
Tetraciklinek	minimális
Szulfonamidok	nagyfokú
Makrolidok	minimális
Aminoglikozidok	változó (minimális-magas)
Azokok	mérsékelt
Makrociklikus laktonok	változó (minimális-mérsékelt)
Linkozamidok	mérsékelt
Fluorokinolonok	változó (mérsékelt-magas)

minimális: < 20%; mérsékelt: 20-80%; nagyfokú: >80%.

4.3. A környezetbe való kijutás módja

A hatóanyagok környezetbe történő kijutásának egyik lehetséges útja a halgazdaságokban végzett kezelés. A különböző hatóanyagok a haszonállatok vizeletével, bélsarával, továbbá a külső, helyi kezelések lemosódása révén szintén bejuthatnak a talajba (Boxall et al., 2003a).

A halgazdaságokban a halak kezelésére vonatkozó szabályozás Európában országonként eltérő. Norvégiában vannak elérhető halgyógyászati készítmények és ezek használhatók is, más országokban ennek hiányában meglehetősen nehéz bármilyen vízkezelés (azaz a víz fiziko-kémiai tulajdonságainak megváltoztatása), vagy a halak gyógykezelése. Magyarországon nincs regisztrált készítmény, amely alkalmazható lenne, de elviekben állatorvos által elrendelt kezelésre lehetőség van más gazdasági állatok számára engedélyezett hatóanyagú gyógyszerekkel, amelynek feltételeit a halgazdaságok tevékenységére vonatkozó jogszabályi keretek határozzák meg (Baska, 2008).

A gyógyszergyártásban, a szigorú ellenőrzésnek köszönhetően, alacsony környezeti terheléssel számolhatunk (Boxall et al., 2003a). Kivételt az esetlegesen előforduló balesetek jelenthetnek (Wessberg et al., 2008).

Egyes tanulmányok megemlítik az állatgyógyászati készítmények környezetbe való kijutásának lehetséges módjaként az aeroszol, illetve por formájában történő szennyezést,

de ennek gyakorlati jelentősége egyelőre nem ismert. Hasonlóképpen kismértékű lehet a társállatok kezelése során jelentkező, illetve a veszélyes hulladék nem megfelelő kezeléséből eredő környezeti szennyeződés is (Boxall et al., 2003a, Sarmah et al., 2006).

Mivel Magyarországon a halgazdaságokban az állatgyógyászati készítmények felhasználása elhanyagolható, az egyéb gazdasági állatok kezelésére felhasznált gyógyszerek jelenthetik a legnagyobb mértékű terhelést a környezetre. Legelőn tartott állatok esetében a kültakaróról, valamint az ürüleből és vizeletből az állatgyógyászati anyagok közvetlenül jutnak a talajra, illetve a talajba. A zárt tartásban élő állatok esetében a talajba való kijutást megelőzi egy hosszabb-rövidebb trágyaérlelési időszak is.

4.4. Trágyaérlelés

Az istállózott haszonállatok esetében nagy mennyiségű trágya, illetve hígtrágya keletkezik, amelyet jellemzően, változó idejű tárolást követően, a talaj trágyázására használnak fel. A trágyaérlelés időtartama a legelőre való kihelyezést megelőzően legalább hatvan nap. A többször módosított 4/2004. (I. 13.) FVM rendelet, valamint a 81/2007. (IV. 25.) Kormányrendelettel módosított 49/2001 (IV. 3.) Kormányrendelet szerint trágya nem juttatható ki felszíni víztől, forrástól, emberi fogyasztásra, illetve állatok itatására szolgáló kúttól tíz méteres sávban, valamint hullámtereken, parti sávokban és vízjárta területeken. Trágyalé, hígtrágya betakarítás után csak akkor juttatható ki a szántóterületre még az adott évben, ha a trágyázás és a megfelelő talajfedettséget biztosító növény vetése közötti idő nem több mint tizennégy nap. Tilos a trágya kijuttatása december 1. és február 15. között. Nem juttatható ki trágya fagyott, vízzel telített, összefüggő hótakaróval borított talajra. A gazdálkodó istállótrágyát csak szigetelt alapú, a csurgalékvíz összegyűjtésére szolgáló gyűjtőcsatornával és aknával ellátott, legalább hathavi trágyamennyiség tárolására alkalmas trágyatelepen, hígtrágyát legalább hathavi trágyamennyiség tárolására alkalmas szigetelt tartályban, medencében tárolhat.

A mezőgazdasági gyakorlatban a trágyaérlelés időtartama nagyon változó. Általában a trágyaérlelés addig tart, amíg a trágya tárolására szolgáló medence meg nem telik, illetve amikor a szántóföldek trágyázása időszerűvé válik. Így a mezőgazdasági földek kezelésére hónapokon keresztül érlelt trágyát és friss trágyát is használhatnak. Ha a friss trágya az állat gyógykezelésére használt készítményből származó anyagot tartalmaz, akkor az a kiürülési koncentrációban kerülhet a talajra anélkül, hogy a trágyában bármilyen mértékű bomlása

bekövetkezhetne, majd onnan a trágyaszóró gépek segítségével, illetve a trágya beszántásával a mélyebb talajrétegekbe juthat.

Hasonló kockázatot jelenthet a mélyalmos trágya is. Ez ugyanis, amennyiben nem ütközik más előírással, előzetes tárolás nélkül is kijuttatható a szántóföldekre a jogszabályi előírások szerint. Viszont, ha a trágya közvetlen kijuttatását egyéb előírások nem teszik lehetővé, akkor az istállótrágyával azonos módon kell tárolni és kezelni. Az Egyesült Királyságban vizsgálták a trágyák tárolási idejét. Hígtrágya esetében az érlelési idő 0 és 50 hónap között változott (átlag 9 hónap), míg mélyalmos trágya esetében ez az érték 0 és 48 hónap volt 6 hónapos átlaggal (Boxall et al., 2003b, Kümmerer, 2004, Sarmah et al., 2006).

Irodalmi adatok alapján, hígtrágyában legnagyobb koncentrációban tetraciklinek és néhány szulfonamid fordul elő. Egy kilogramm nedves trágyára vonatkoztatva a tetraciklinek 66 mg/kg, a szulfonamidok pedig 40 mg/kg maximális koncentrációban voltak kimutathatók (Kümmerer, 2004, Winckler és Grafe, 2001). A trágya érlelése során az állatgyógyászati készítmények további bomlási folyamaton mehetnek át, és napokig (pl. tilozin sertéstrágyában; penicillin, nikarbazin baromfialomban), illetve akár hónapokig (pl. ivermektin, klórtetraciklin, amprolium) is jelen lehetnek. A lebomlás mértéke függ a trágya típusától is. A trágyában a metabolit esetenként vissza is alakulhat az anyamolekulává (Loke et al., 2000, Boxall et al., 2003a).

2. táblázat Antibiotikumok perzisztálása a trágyában (Kümmerer, 2004)

Antibiotikum	Mátrix	DT ₅₀ (nap)*
Tilozin	sertés hígtrágya	<2
Ivermektin	legeltetett borjú trágyája	>45
Szulfaklórpiridazin	brojleralom	<8
Szulfaklórpiridazin	tojótyúkalom	<3 hónap
Szulfaklórpiridazin	sertés hígtrágya	>8
Klórtetraciklin	csirketrágya + talaj	>30
Tetraciklin	sertéstrágya	4.5-9; 48
Oxitetraciklin	sertéstrágya + alom	30
Doxiciklin	sertéstrágya	15
Amprolium	tojótyúkalom	>8
Amprolium	brojleralom	>3 hónap
Nikarbazin	brojleralom	>8

* DT₅₀: az az időtartam, amely alatt a vizsgálandó anyag koncentrációja a felére csökken

A trágyában a lebomlás mértékét és ütemét számos tényező befolyásolja. A felezési idő függ a gyógyszer típusától, az állatfajtól (2. táblázat), a trágya fizikai-kémiai paramétereitől és a környezeti körülményektől (Fernández et al., 2004, Thielle-Bruhn, 2003). Hatvannapos trágyaérlelési időszakot alapul véve azt kell feltételeznünk, hogy ha az állatokat állatgyógyászati készítménnyel kezelték, akkor a trágya a felhasználáskor antibiotikumot vagy egyéb hatóanyagot tartalmazhat, ugyanakkor kellően hosszú érlelési idővel jelentősen csökkenthető a környezet terhelése.

4.5. Viselkedés a környezetben

A talajokba, illetve vizekbe jutott állatgyógyászati készítmények hatóanyagainak jelenléte hosszabb-rövidebb ideig kimutatható azokban. Vannak hatóanyagok, amelyek napokig, míg mások hónapokig, esetleg évekig perzisztálhatnak a környezetben. A hatóanyagok között találunk gyorsan lebomló (diazinon, olaquinox, tilozin), lassan lebomló (ivermektin, ceftiofur, metronidazol) és nagyon lassan lebomló (szarafloxacin, tetraciklinek) tulajdonságúakat is (Boxall et al., 2003b, Kümmerer, 2004).

A trágyázást követően a fő lebomlási mód az állatgyógyászati készítmények maradékanyagai esetében az aerob biodegradáció. A környezetben egy hatóanyag viselkedése, lebomlásának mértéke és időtartama függ az adott vegyület tulajdonságaitól (vízben való oldhatóság, pH, illékonyág, szorpciós-, kationkötő, illetve komplexképző képesség, hidrogénkötés kialakítására való hajlam). Az állatgyógyászati készítmények hatóanyagainak talajra, illetve üledékre vonatkoztatott megoszlási koefficiense (K_d) igen különböző. Például a szulfonamidoké 0,6–4,9, a tetraciklineké 290–1620, a fluorokinolonoké 310–6310 l/kg között változhat (Thiele-Bruhn, 2003).

A lebomlás sebességét befolyásolják a környezeti tényezők, mint pl. a hőmérséklet, a talaj típusa, a pH, a redox-potenciál és a mikroorganizmus populáció milyensége is (Boxall et al., 2003b, Sarmah et al., 2006).

Az eddigi vizsgálatokból látható, hogy a talajtípus is nagy jelentőségű a felezési idő szempontjából. Bár egyes hatóanyagok (virginiamicin) minden talajtípusban azonos ütemben bomlanak le, a vegyületek jelentős részének eltérő a lebomlási ideje például a homok és az agyag talajokban (3. táblázat). A metronidazol lebomlása gyorsabb homok talajban, míg a ceftiofur, az ivermektin és a diazinon agyag talajokban bomlik le nagyobb sebességgel. A diazinon gyorsan lebomlik vízzel borított talajban (DT_{50} : 1,7 nap), míg homok talajban 88–

112 nap a degradációs idő (Kümmerer, 2004). Az ivermektin lebomlásának hőmérsékletfüggését vizsgáló tanulmányban Halley et al. (1993) a felezési időt télen 91–127, míg nyáron 7–14 napnak találták.

3. táblázat Állatgyógyászati készítmények hatóanyagainak perzisztálása különböző talajtípusokban (Kümmerer, 2004)

Anyag	Talajtípus	DT ₅₀ (nap)*
Metronidazol	agyagtalaj	13,1-27
	homoktalaj	9,7-14,7
Flavomicin	nem ismert	<30
Ceftiofur	agyagtalaj	22,2
	homoktalaj	49,0
	iszapos agyagtalaj	41,4
Danofloxacin	több talajtípus	87-143
Olaquinox	agyagtalaj	5,8-7,5
	homoktalaj	5,9-8,8
Sarafloxacin	több talajtípus	<80
	agyagtalaj	<65
Tilozin	agyagtalaj	3,3-8,1
Emamektin	nem ismert	174-427
Ivermektin	agyagtalaj	14-28
	homoktalaj	56
Diazinon	nem ismert	1,7
	agyagtalaj	21-35
	homoktalaj	112
Benzil-penicillin	nem ismert	<0,13
Deltametrin	nem ismert	<23
Virginiamicin	több talajtípus	>64

* DT₅₀: az az időtartam, amely alatt a vizsgálandó anyag koncentrációja a felére csökken

A hatóanyag kémiai szerkezetétől függően a talajokban a biodegradáción kívül más lebomlási mechanizmusok, így a fotolízis vagy a hidrolízis is jelentős szerepet játszhatnak. A

photodegradáció csak a talaj felszínén következhet be, így a fényre érzékeny molekulák perzisztálását jelentősen befolyásolják az olyan mezőgazdasági munkafolyamatok, mint a szántás ideje és mélysége (Kümmerer, 2004). A talajok ásványanyag-tartalma, összetétele, valamint különösen a talaj szervesanyag-tartalma nagymértékben befolyásolja az állatgyógyászati készítmények hatóanyagainak kinetikáját és lebomlását (Ingerslev és Halling-Sørensen, 2001, Kümmerer, 2004).

Az antibiotikumok és más hatóanyagok talajban mérhető koncentrációjának csökkenése nem csak a lebomlásuk következménye lehet. Számos esetben a talajból való kimosódás miatt mérhetünk idővel alacsonyabb koncentrációt. Egyes gyógyszer-alapanyagok, mint pl. a szulfonamidok kisfokú abszorpcióra képesek, ezért gyorsan a talaj-, illetve felszíni vizekbe jutnak. Míg a nagyobb abszorpciós képességűek (tetraciklinek) sokkal lassabban érik el a víztereket (Boxall et al., 2003a, Boxall et al., 2003b).

Az utóbbi időben számos állatgyógyászatban használatos hatóanyag talajban való mozgását vizsgálták. Több antibiotikum erős komplexképző tulajdonságot mutatott agyagtalajban. A bacitracin és a klórtetraciklin alkalikus talajban meglehetősen instabilnak, míg az oxitetraciklin stabilnak bizonyult (Kümmerer, 2004). Tetraciklinek esetében a következő mechanizmusokat találták felelősnek a talajban történő felszívódásáért: kationcserélő képesség, agyagásványokhoz való kationos kötődés, komplexképzés és hidrogénkötés kialakítására való hajlam. A tetraciklinek huminsavhoz és tőzeghez való kötődését vizsgálva azt tapasztalták, hogy abszorpciójuk szervesanyagban gazdag talajokban pH-függő: erősebb kötődési képességet mutat 4,0–7,0 pH értéken, mint magasabb pH tartományban (Sarmah et al., 2006).

Korlátozott számban állnak rendelkezésre olyan tanulmányok, amelyekben a talajban történő biotranszformációt vizsgálták. Az anyamolekula nem csak a kezelt állatban, hanem a talajban is metabolitokká alakulhat át. Ingerslev és Halling-Sørensen (2001) vizsgálataiban az oxitetraciklin három átalukálási termékét sikerült kísérletesen kimutatni. A talajokban és a vizekben az állatgyógyászati készítmények a lebomlás során általában veszítenek hatékonyságukból, de előfordul az is, hogy az anyamolekulához hasonló aktivitású metabolit keletkezik (Boxall et al., 2003a, Sarmah et al., 2006).

Mivel egy adott területen egyszerre számos kémiai anyag lehet jelen, ezért a környezetre kifejtett hatásuk is egyszerre, együttesen jelentkezik. Additív, antagonistá és szinergista hatás egyaránt kialakulhat, és így növelhetik, vagy éppen csökkenthetik egymás környezetre gyakorolt hatását. A talaj mikrobáira jelentős hatással lehetnek az antibiotikumok, így feltételezhetjük, hogy csökkentik az egyéb gyógyszermaradványok, kémiai anyagok

baktériumok által történő lebomlásának mértékét. Ez a probléma előfordulhat a szennyvíztisztító üzemek működésében is. Erre vonatkozóan a mai napig nem állnak rendelkezésre vizsgálati eredmények (Kong et al., 2006, Martínez-Carballo et al., 2007).

4.6. Milyen készítmények környezeti jelenlétével lehet számolni?

Az eddigi vizsgálatok szerint a trágyázott mezőgazdasági talajokban elsősorban a tetraciklinek és a szulfonamidok fordulnak, illetve fordultak elő a legnagyobb koncentrációban. Tetraciklinek esetében a széles körű használat és a trágyában mérhető magas koncentráció magyarázza ezt. Emellett nyomokban számos más hatóanyag (makrolidok, tiamulin, trimetoprim) is kimutatható (4. táblázat) (Boxall et al., 2003b, Boxall et al., 2005, Sarmah et al., 2006).

4. táblázat Antibiotikumok maximális koncentrációja trágyázott talajban

Antibiotikum	Minták száma	Maximális koncentráció (mg/kg)	Hivatkozás
Tetraciklinek			
Oxitetraciklin	1	<0,01 0,305	De Liguoro et al. (2003), Boxall et al. (2005)
Tetraciklin	60	0,31 (0,2) 0,45-0,9	Hamscher et al. (2002) Winckler és Grafe (2001)
Klórtetraciklin	14	0,03 0,039	Hamscher et al. (2000), Hamscher et al. (2005)
Szulfonamidok			
Szulfadimidin		0,011	Hamscher et al. (2005)
Szulfametazin	14	0,002-0,011	Höper et al. (2002), Boxall et al. (2005)
Szulfadiazin	14	<0,001	Höper et al. (2002)
Szulfatiazol	14	<0,001	Haller et al. 2002)
Szulfamerazin	14	<0,001	Höper et al. (2002)

Antibiotikum	Minták száma	Maximális koncentráció (mg/kg)	Hivatkozás
Szulfametoxi-piridazin	14	<0,001	Höper et al. (2002)
Szulfametoxazol	14	<0,001	Höper et al. (2002)
Szulfadimetoxin	14	<0,001	Höper et al. (2002)
Makrolidok			
Tilozin	14	<0,001	Hamscher et al. (2002)
Linkomicin		0,0085	Boxall et al. (2005)
Egyéb			
Szalinomicin	2	<0,0016	Schlüsener et al. (2003)
Tiamulin	2	0,0007	Schlüsener et al. (2003)
Trimetoprim		0,0005	Boxall et al. (2005)

Huszonöt évvel ezelőtt Angliában mutattak ki először antibiotikumokat (szulfonamidot, makrolid antibiotikumot és tetraciklint) felszíni vizekben, majd később számos egyéb antibiotikumot is detektáltak. 1999-ben Németország egyik folyójában klóramfenikolt találtak. Ezt a hatóanyagot a humán gyógyászatban ma már ritkán használják, állatorvosi alkalmazását pedig az Európai Közösség betiltotta 1995-ben. A felszíni vízben történt kimutatás utalhat esetleges engedély nélküli használatra, illetve a környezetben való tartós jelenlétre is (Boxall et al., 2003b, Boxall et al., 2005, Hirsch et al., 1999, Sarmah et al., 2006).

Talajvizekből elsősorban szulfonamidot, klórtetraciklint, oxitetraciklint, tetraciklint és tilozint mutattak ki általában kevesebb, mint 1 µg/l nagyságrendben (5. táblázat). A felszín alatti vizekben számos olyan hatóanyagot találtak, amelyeket kizárólag állatgyógyászati célra használnak. Az Egyesült Államokban 500–4000 µg/kg nagyságrendben oxitetraciklint mutattak ki tengeri üledékben. A szennyezés eredete halgazdaságokra volt visszavezethető (Hirsch et al., 1999, Sarmah et al., 2006).

5. táblázat Antibiotikumok koncentrációja vizekben

Antibiotikum	Forrás	Koncentráció (mg/kg)	Hivatkozás
Tetraciklinek			
Oxitetraciklin	időszakos vízborítás	0,032	Kay et al. (2005)
Tetraciklin	talajvíz	0,0004	Kolpin et al. (2002)
Klórtetraciklin	felszíni víz	0,00007	Kemper (2008)
Szulfonamidok			
Szulfametazin	talajvíz	0,00024	Hamscher et al. (2005)
Szulfadiazin	felszíni víz	0,004	Boxall et al. (2005)
Szulfametoxazol	talajvíz	0,0004	Sacher et al. (2001)
	felszíni víz	0,0005	Hirsch et al. (1999)
	ivóvíz	0,00007	Kemper (2008)
Makrolidok			
Tilozin	felszíni víz	0,00005	Ashton et al. (2004)
Egyéb			
Trimetoprim	felszíni víz	0,00002-0,0002	Boxall et al. (2005), Hirsch et al. (1999)

Az Egyesült Királyságban felmérést végeztek annak megállapítására, hogy mely hatóanyagok környezeti jelenlétével kell elsősorban számolni. Ehhez figyelembe vették a forgalmazási, felhasználási adatokat, azt hogy milyen állatok kezelésére használják az adott készítményeket, a kezelés módját, a hatóanyag metabolizációját a célállatban, a toxikológiai jellemzőket (ahol rendelkezésre álltak toxikológiai vizsgálatok adatai, illetve ADI – Acceptable Daily Intake – értékek alapján). Ezen adatok összevetése és elemzése alapján az Egyesült Királyságban állatgyógyászati céllal felhasznált készítmények hatóanyagai közül azokat, amelyek ökotoxikológiai szempontból a leginkább környezetszennyezőknek tartottak (és ezek további vizsgálatát, detektálását tekintették a legfontosabbnak), a 6. táblázat szemlélteti (Boxall et al., 2003b, Boxall et al., 2005, Capleton et al., 2006).

6. táblázat Állatgyógyászati készítmények hatóanyagai, melyek nagy valószínűséggel juthatnak a környezetbe

Hatóanyagok		
Albendazol	Klórhexidin	Prokain benzilpenicillin
Amoxicillin	Klórtetraciklin	Prokain penicillin
Baquiloprim	Florfenikol	Prokain-hidroklorid
Deltametrin	Flumetrin	Szalinomicin Na
Doramektin	Levamisol	Sarafloxacin
Diazinon	Mebendazol	Szulfadiazin
Dihidrosztreptomycin	Medroxyprogeszteron	Tetraciklin
Emamektin benzoát	Monenzin	Toltrazuril
Altrenogest	Nitroxinil	Trimetoprim
Bronopol	Oxfendazol	Tilozin
Klavulánsav	Oxitetraciklin	

(Boxall et al., 2003b, Boxall et al., 2005, Capleton et al., 2006)

4.7. Milyen hatások jelentkezhetnek?

Az OECD által kiadott irányelvek, guideline-ok alapján toxicitási vizsgálatokat szükséges végezni meghatározott hal, vízibolha, alga, mikroorganizmus, földigiliszta, növény fajokon és esetenként egyes egyéb gerinctelen állatokon is, igazolva a hatóanyagok, illetve készítmények ártalmatlanságát (Lokke – van Gestel, 1998, OECD, 1984). Állatgyógyászati készítmények esetében akut toxicitási vizsgálatokat gyakran végeznek vízibolhákban, de az algákra és különösen a halakra vonatkozó információk száma korlátozott. Hasonló a helyzet a talajban lakó organizmusok esetében is (Boxall et al., 2003a). A vizsgálatok adatai alapján a földigiliszták érzékenyek például a parazitaellenes hatóanyagokra, a növények pedig a mikrobaellenes vegyületekre, illetve a makrociklikus laktonokra. Ez a hatás a növekedés és a szaporodás gátlásában nyilvánul meg elsősorban. Az antibiotikumok értelemszerűen a talaj mikrobáira a legtoxikusabbak (Boxall et al., 2003a, Kümmerer, 2004, Sarmah et al., 2006).

Szükség lenne a trágyában élő gerinctelenekre vonatkozó ökotoxicitási vizsgálatokra, illetve az antiparazitikumok (makrociklikus laktonok, benzimidazolok, stb.) mellett egyéb állatgyógyászati készítményekre is kiterjeszteni ezeket a vizsgálatokat. Az eddigi adatok szerint a makrociklikus laktonok inkább a juvenilis formákra, míg a piretroidok a kifejlett

szervezetekre toxikusak. A benzimidazolok esetében, szemben az előbbi két hatóanyagcsoporttal, mortalitás nem volt jellemző (Boxall et al., 2003a, Kümmerer, 2004, Sarmah et al., 2006).

Néhány kivételtől eltekintve kevés vizsgálati adattal rendelkezünk az állatgyógyászati készítmények lebomlása során keletkező metabolitokról. Általában az anyamolekulához képest kisebb antibakteriális hatású lebomlási termékek is lehetnek igen aktívak. Például a tetraciklin és az anhidrotetraciklin esetében tapasztaltak közel azonos hatáserősséget. Az anhidrotetraciklin EC_{50} értéke (a maximális hatás feléhez tartozó koncentráció) iszapban élő baktériumokra 0,03 mg/l, míg a tetracikliné 0,08 mg/l. A nagyobb hatáserősség mellett az anhidrotetraciklin mobilisabb, könnyebben és gyorsabban jut a talajból a vizekbe (Boxall et al., 2003a, Kümmerer, 2004, Sarmah et al., 2006). Amennyiben például egy metabolit vízoldhatósága jó, akkor valószínűleg a talajvízbe, illetve a felszíni vizekbe is könnyen bekerül.

Ugyancsak kevés adat ismert az állatgyógyászati készítmények hatóanyagainak hosszabb időtartamú, alacsony koncentrációban kifejtett hatásairól a talajban, a trágyában és a vízi üledékben élő mikrobákra, egyéb élőlényekre. A szulfátredukció gátlása révén csökkenhet a szerves anyagok lebomlása, valamint zavar jelentkezik a mikrobák táplálkozásában, növekedésében, fejlődésében, és a szaporodásában (Kümmerer, 2004, Sarmah et al., 2006).

Az állatgyógyászati célból felhasznált készítmények hatóanyagai közvetlenül vagy a természetesen ható ökológiai tényezők megváltoztatásán keresztül hatnak az élőlényekre. A talajminőség jellemzésében, így az ökotoxikológiai vizsgálatokban is az úgynevezett mikrobiális indikátorok alkalmazásának számos előnye van:

- a mikroorganizmusok a változásokra gyorsan reagálnak, és gyorsan alkalmazkodnak a környezeti feltételekhez;
- nagy felület/térfogat arányuk miatt sokkal szorosabb kapcsolatban vannak a környezetükkel, mint a magasabb rendű élőlények;
- a mikrobiális populációkban és aktivitásukban bekövetkező változások, gyakran megelőzve a talaj fizikai és kémiai tulajdonságaiban kimutatható eltéréseket, a talajállapot korai figyelmeztető jele lehet;
- a talaj-mikroorganizmusok nagyon sok talaj-folyamatban vesznek részt (Szili-Kovács – Takács, 2008).

Az antibiotikumok és egyéb állatgyógyászati szerek talajlakó mikroorganizmusokra kifejtett hatásai számos módon kimutathatók. Ezek között a leggyakrabban vizsgált jellemzők a mikroorganizmusok száma, aránya, diverzitása, illetve aktivitása. A mikrobiális aktivitás meghatározására a szakirodalom a következő tulajdonságokat említi: talajlégzés (alaplégzés és szubsztrát indukált légzés), nitrogén transzformáció, dehidrogenáz aktivitás, vas (Fe(III)) redukció, foszfatáz aktivitás, szulfát redukció, invertáz aktivitás, stb. (Westergaard et al., 2001, Schmitt et al., 2005, Thiele-Bruhn és Beck, 2005, Kong et al., 2006, Hammesfahr et al., 2008, Kotzerke et al., 2008, Liu et al., 2009). Az EMEA által kiadott irányelv (CVMP, 2008) szerint egy állatgyógyászati készítmény esetében a talaj mikroorganizmusaira kifejtett hatást a nitrogén transzformációs vizsgálattal kell jellemezni. Ugyanakkor a talajlakó mikrobák anyagcseréjük révén befolyásolják a környezetük redoxpotenciálját. Amennyiben a mikroorganizmusok élettevékenységeit a talajba kerülő kémiai anyag gátolja, ez valószínűleg mérhető a redoxpotenciál változásán keresztül. Ilyen jellegű vizsgálatok a szakirodalomban viszont egyáltalán nem találhatók.

A rezisztencia problémája nem új keletű, és napjainkban is súlyos gondokat okozhat. Az antibiotikumok állatgyógyászati felhasználása egyes esetekben jelentős mértékben növelheti a humán terápiában alkalmazott antimikrobiális szerekkel szembeni rezisztencia mértékét (pl. fluorokinolonok) (Boxall et al., 2003a, Shoemaker et al., 2001). Hasonlóképpen a mikroorganizmusok bizonyos hatóanyagokkal szembeni rezisztenciájának kialakulása és elterjedése háttérben, legalábbis részben, a környezetbe kijutó, kis koncentrációban jelen lévő antibiotikumok is állhatnak. Ezt támasztja alá, hogy számos halgazdaság vízelvezető csatornájánál gyűjtött, illetve sertés trágyával kezelt talajból származó mintákban találtak rezisztens mikrobákat. Egy svédországi vizsgálat során nyolc hónapon át gyűjtöttek mintákat egy mezőgazdasági talajból, amelyet sertés trágyával kezeltek. A trágyázást követően a rezisztens baktériumok aránya számottevően nőtt (Kümmerer, 2004, Sarmah et al., 2006).

Összességében megállapítható, hogy az állatok kezelésére, és elsősorban a haszonállatok esetében tömegkezelésre használt állatgyógyászati szerek környezetre, annak élővilágára gyakorolt hatásainak feltárása, értékelése egyre nagyobb jelentőségű. Tanszékünkön az elmúlt években, új kutatási irányként, az állatgyógyászati szereknek a fogyasztó és az állat egészségére gyakorolt hatásainak vizsgálata mellett, bevezettük a környezetre kifejtett egyes hatásaik tanulmányozását is, végigkövetve egyes hatóanyagok útját az állatból történő kiürülést követően, a trágyaérlelésen keresztül, a talajban történő lebomlástól át a talajlakó faunára kifejtett hatásukig.

Ennek megfelelően jelen kutatásaink első részében a doxiciklin trágyában való lebomlását vizsgáltuk *in vitro*, valamint telepi körülmények között. A kutatás második részében a korábbi

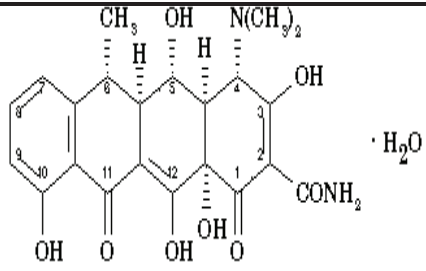
kísérleti fázisban érlelt, doxiciklin tartalmú trágyát juttattuk ki szántóföldre és a beszántást követően, a helyszínen vett minták analízisével határoztuk meg a doxiciklin lebomlását mezőgazdasági talajban, természetes körülmények között. A harmadik vizsgálati fázisban, a doxiciklinnek a talaj mikroorganizmusaira kifejtett hatását tanulmányoztuk két külön kísérletsorozatban. Az első vizsgálatban doxiciklint adagoltunk különböző koncentrációban talajmintákhoz és egy adott inkubációs periódus alatt vett minták elemzésével határoztuk meg az antibiotikumnak a mikrobák nitrogén-transzformációs képességére kifejtett hatását a kontroll mintához viszonyított nitrátermelés alapján. Majd ezt követően egy további kísérletsorozatban egy új, nemrég kifejlesztett, gyors mikrobiológiai detektációs módszert használtunk. A mérőrendszer a redoxpotenciál változásának mérésén keresztül nyújt információt a mintában jelen lévő mikrobákról, illetve azok aktivitásáról. Ebben a kísérletben a doxiciklinnek és négy másik antibiotikumnak a talajlakó mikroorganizmusokra kifejtett hatását tanulmányoztuk.

4.8. Doxiciklin jellemzése

4.8.1. Általános leírás

A tetraciklinek régóta és széles körben használt antibiotikumok. A doxiciklint az 1960'as években fejlesztették ki; a vegyületet a *Streptomyces rimosus* fermentlevéből izolált oxitetraciklin félszintetikus származéka. Kémiailag 4 kondenzált gyűrűt tartalmazó hidronaftacén-karboxiamid-származék. A doxiciklint általában két formában alkalmazzák a gyógyászatban: monohidrát és hiklát alakjában (7-8. táblázat) (Semjén és Laczay, 1998).

7. táblázat A doxiciklin monohidrát jellemzői

Név	Kémiai szerkezet	Kémiai név	Molekulaforma	Molekulatömeg
Doxiciklin-monohidrát		Doxiciklin-monohidrát	$C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot H_2O$	462,46

8. táblázat A doxiciklin hiklát jellemzői

Név	Kémiai szerkezet	Kémiai név	Molekulaforma	Molekulatömeg
Doxiciklin-hiklát		Doxiciklin hidroklorid hemihidrát hemi- etanolát	$C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HCl$.1/2 $C_2H_5OH.1/2$ H_2O	512,94

A doxiciklint szájon át kapszula, tableta, porkeverék, granulátum, paszta vagy szuszpenzió formájában adagolják. Gyorsan és majdnem teljesen felszívódik a gyomor-bél csatornából. A tetraciklinek kristályos, sárga, vízben alig oldódó amfoter anyagok. Savakkal és lúgokkal egyaránt sók képeznek, sóik vízben oldódnak. Alkalikus közegben gyorsan, savas közegben a klórtetraciklin kivételével lassan bomlanak, poralakban stabilak (Semjén és Laczay, 1998).

4.8.2. Hatásmechanizmus

A tetraciklinek aktív transzporttal jutnak át a hatásukra érzékeny baktériumok belső membránján. Szelektív toxicitásukat lényegében ez biztosítja, ugyanis a gazdaszervezet sejtjeiben ez az aktív transzportmechanizmus hiányzik. A baktériumok által felvett tetraciklinek a riboszóma 30S alegységéhez és az mRNS-hez kötődve megakadályozzák az aminosavak kapcsolódását a növekvő peptidlánchoz, tehát a fehérjeszintézist gátolják. Az állati sejtekben csak igen nagy koncentrációban zavarják meg a fehérjék felépítését. A hatóanyag antibakteriális hatása bakterosztatikus, amely az intra- és extracellulárisan elhelyezkedő baktériumokra egyaránt érvényesül. Aktivitásukat a szérum, a vér, a genny alig mérsékeli (Semjén és Laczay, 1998).

A doxiciklin a többi tetraciklinhez hasonlóan szintén bakteriosztatikus hatású. Számos Gram-pozitív és Gram-negatív baktérium, valamint bizonyos egyéb mikroorganizmus ellen hat.

- Általában érzékeny mikroorganizmusok: *Brucellák*, *Pasteurellák*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydiák*, *Rickettsiák*, *spirochaeták*.

- Nem minden esetben érzékeny mikroorganizmusok (10-40%-ban rezisztens törzsek): *Staphylococcusok*, *Streptococcusok* (A, C és G csoport), *Escherichia coli*, anaerobok (*Clostridiumok*, *Fusobacterium*).
- Rezisztens törzsek (MIC 16 µg/ml): B és D csoportba tartozó *Streptococcusok*, *Pseudomonas-ok* és *Mycobacterium tuberculosis*.

Rezisztencia viszonylag lassan, több lépcsőben alakul ki a doxiciklinnel szemben, és rendszerint az aktív transzport zavarán, azaz a sejtmembrán áteresztőképességének csökkenésén alapul. Mivel a rezisztencia genetikailag R-plazmidhoz kötött, hajlamos a gyors terjedésre, amit a tetraciklinek széleskörű alkalmazása is elősegít. Adott területen a kialakult rezisztencia hosszú ideig megmarad (Semjén és Laczay, 1998).

4.8.3. Farmakokinetika

A szájon át adott tetraciklinek a gyomorból passzív diffúzióval, a vékonybél elülső szakaszán aktív transzport révén szívódnak fel. A felszívódás mértéke azonban készítményenként és állatfajonként változik. Etetés előtt a felszívódás jobb, mint a takarmánnyal, táplálékkal való együttadáskor. Tej, tejpótló szerek, Ca-, Mg-, Zn-sók, valamint a vaskészítmények a kelátképződés miatt jelentősen csökkentik a felszívódását. A lipofilabb doxiciklin a bélből jobban szívódik fel, értékesülését a táplálék összetétele alig befolyásolja (Gallo-Torres, H.E., 1990).

Intramuskuláris alkalmazáskor az egyes készítmények szövetizgató hatásától függően változó mértékben, de a szájon át történő beadáshoz viszonyítva jobban felszívódnak; a maximális vérszint 3-6 órán belül alakul ki. A depókészítmények tartós, de viszonylag alacsony vérszintet biztosítanak (Semjén és Laczay, 1998).

Az oxitetraciklin kevésbé, a doxiciklin kifejezettebben kötődik a plazmafehérjékhez. A tetraciklinek szöveti megoszlása gyors és kiterjedt. A legnagyobb koncentrációt a májban és a vesében érik el, az epében a vérszint többszöröse mérhető, de a vérszintet meghaladó koncentrációban vannak jelen a tüdőben, a lépben és csaknem valamennyi testfolyadékban. Átjutnak a tejbe, az ondófolyadékba és a magzatba. A liquorban azonban, a doxiciklin és monociklin kivételével, a tetraciklinek csak korlátozott mennyiségben jelennek meg. Megoszlási térfogatuk nagyobb, mint a szervezet víztérfogata. Ez arra utal, hogy egyes testszövetekben feldúsulnak. A csontszövetben, a fogakban tartósan deponálódnak, a szövethez azonban csak reverzibilisen kötődnek (Semjén és Laczay, 1998).

A doxiciklin a májban metabolizálódik és főként inaktív formában a bélsárral ürül, ezért vesekárosodás esetén is alkalmazható. Valamennyi tetraciklin, bár eltérő mértékben, de részt vesz az enterohepaticus keringésben. A doxiciklin és a monociklin eliminációja elhúzódóbb, mint a hagyományos tetraciklineké, ezért hatásuk tartósabb lehet. Ennek ellenére nem halmozódnak fel a szervezetben, bélfőrákárosító hatásuk is kisebb (Semjén és Laczay, 1998).

4.8.4. Toxicitás, mellékhatások

A tetraciklinek lovak és fiatal állatok kivételével viszonylag biztonságosan alkalmazható, nem toxikus antibiotikumok. Több mellékhatásuk ismert ugyanakkor; legjelentősebb ezek közül a bélfőrák károsító hatásuk. Még parenterális applikáció esetén is okozhatnak dysbiosist, és szuperinfekcióval (gombák, rezisztens baktériumok elszaporodásával) is számolni kell. Lóban súlyos enterocolitist okozhatnak. Ragadozóknál a gyomor nyálkahártyájának izgatásával émelygést, hányást idézhetnek elő. Intramuszkuláris bevitelkor fennáll a szövetizgalom veszélye, illetve szarvasmarhánál a gyors intravénás befecskendezéskor viszonylag gyakori lehet a kollapszus, a kalciumkelát képződése miatt. A tetraciklinek a vemhesség késői szakaszában kezelt állatok magzataiban a fogak elszíneződését, a fogzománc károsodását, esetenként pedig a csontok hosszanti növekedésének a zavarát idézhetik elő. A tetraciklinek potenciálisan hepato- és nephrotoxikusak. Máj- és veseműködés zavarakor az alkalmazásuk megfontolandó. Fotoszenzibilálnak, igen ritkán allergizálnak, enyhe immunszuppresszív hatásuk is van (Semjén és Laczay, 1998).

Alkalmazásuk meglehetősen széleskörű, a vegyületeket főként actinobacillosis, anaplasmosis, borreliosis, leptospirosis, listeriosis, mycoplasmosis, pasteurellosis, shigellosis, streptococcusok okozta exsudatív dermatitis, mastitis, sertések torzító orrgyulladás, mycoplasmák okozta pneumóniája, baromfi-CRD kezelésére használják. *P. multocida*, *S. aureus*, *E. coli* és *Salmonella* szerotípusok okozta betegségekben viszont csak rezisztenciavizsgálat eredménye alapján célszerű használni (MacDonald, A., 1995, Semjén és Laczay, 1998).

4.8.5. Tetraciklinek és a környezet

A szakirodalmi adatok szerint bizonyos talajtípusokban jelentős mennyiségű antibiotikum képes kötődni a talajrészecskékhez, a talajkolloidokhoz (Rabølle és Spliid, 2000). A talajban

lévő antibiotikum bemosódhat a talajvizekbe nagy mértékben szennyezve azokat, ahonnan aztán ez a gyógyszer tartalmú víz bejuthat a felszíni vizekbe, vagy a fúrt kutak révén az ivóvízhálózatba, az élelmiszer-feldolgozás során felhasznált vizekbe, valamint ennek következtében az előállított élelmiszerekbe (Boxall et al., 2003a).

Környezetvédelmi szempontból fontos azt is megvizsgálni, hogy az antibiotikumok által okozott környezetterhelés milyen hatással van a talaj élővilágára (Baqer et al., 2000). Ezek az élőlények a szerves anyagok körforgásában, lebontásában kiemelten fontos feladatot látnak el, ezért lényeges kérdés, hogy milyen mértékben befolyásolják szaporodásukat, életműködésüket, lebontó tevékenységüket a talajba jutó antibiotikumok.

A tetraciklineket nagy mennyiségben használják az állatgyógyászatban terápiás és megelőző céllal hazánkban csakúgy, mint világszerte (Sarmah et al., 2006). Ugyanakkor a hagyományos tetraciklinek közé tartozó oxitetraciklin, klórtetraciklin és tetraciklin kinetikájára jellemző, hogy felszívódásuk korántsem teljes, ezért nagy adagot kell adni a megfelelő hatékonyság eléréséhez, és így jelentős mennyiség ürül a bélsárral is. A doxiciklin kinetikája eltér a hagyományos tetraciklinekétől. Felszívódása és szöveti megoszlása lényegesen nagyobb mértékű, dózisa kisebb a korábbi származékokhoz viszonyítva, kiválasztódása pedig főként az epével történik (Kümmerer, 2004).

Irodalmi adatok szerint a talajba jutó tetraciklinek nagymértékben kötődnek a talajrészecskékhez és a talaj élővilágát is befolyásolhatják, különösen magas koncentrációban (Kemper, 2008, Kumar et al., 2005, Kümmerer, 2004, Sarmah et al., 2006)

5. Anyagok és módszerek leírása

5.1. Doxiciklin lebomlása sertéstrágyában

5.1.1. In vitro trágyaérlelés

A vizsgálatot 8 vegyes ivarú, átlagosan $23\pm 1,7$ kg testtömegű, növendék sertésen végeztük. Az állatokat a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar (a továbbiakban SZIE ÁOTK) Állathigiéniai, Állomány-egészségtani és Állatorvosi Etológiai Tanszékének klimatizált állatházában, két csoportban, battérián helyeztük el. A sertések korábban nem vettek részt más vizsgálatban, így más állatgyógyászati szerrel való kezelésben sem részesültek. Takarmányozásuk, ivóvízellátásuk 14 napon keresztül folyamatosan, *ad libitum*, növendéksertés-táppal történt. A hőmérsékletet $20\pm 2^\circ\text{C}$ -on tartottuk. A világos és a sötét órák aránya 16:8 volt. Hét nap akklimatizációs periódust követően, az állatokat egy törzskönyvezett doxiciklin tartalmú készítménnyel (Ladoxyn 50% granulátum, gyártási szám: 454095, Lavet Kft., Magyarország) kezeltük 5 napon át. A doxiciklin adagja 20 mg/ttkg volt, amelyet az ivóvízhez adagolva biztosítottunk az állatoknak. Az említett adag a jóváhagyott, a gyakorlatban is alkalmazott dózissal felel meg.

A kezelés megkezdése előtt kontroll trágyamintákat vettünk, majd az állatok bélsarát az 5 napos kezelési időszak alatt egy közös műanyag tartályba gyűjtöttük. Alapos keveréssel történő homogenizálás után a trágyát 300 ml-es, biokémiai oxigénigény (BOD) vizsgálatára szolgáló üvegedényekbe helyeztük, majd lezártuk azokat és $20\pm 3,5^\circ\text{C}$ -on tároltuk, fenntartva az előbbi hőmérsékletet, valamint megfelelő nedvességtartalmat és anaerob viszonyokat a vonatkozó irányelveknek (CVMP, 2008, CVMP, 2011) megfelelően a 16 hetes érlelés teljes időtartama alatt. Tehát a trágya érlelése a 300 ml-es üvegedényekben történt. Mivel 8 mintavételi időpontot határoztunk meg, így összesen $8*3$, azaz 24 db BOD üveget használtunk. Ezeket fóliával fedtük le, és egy vékony tűn keresztül engedték távozni a trágya bomlásával keletkező gázokat. (A 0. időpontban vett mintákat nem fedtük le, mivel azokból rögtön kivettük a vizsgálathoz szükséges almintákat.) Egy-egy mintavételkor 3 edényből 100-100 g mintát vettünk ki, miután a trágyát egy üvegbottal átkevertük. Ezekből a 100g-os mintákból határoztuk meg a doxiciklin koncentrációját. Az első mintavételre a kezelés befejezésekor került sor, majd további mintákat vettünk 1., 2., 4., 6., 8., 12. és 16. héttel a kezelés után. A mintákat a feldolgozásig -30°C -on tároltuk.

5.1.2. Trágyaérelés telepi körülmények között

A vizsgálatot 20 vegyes ivarú, 50-70 kg átlagtömegű, átlagosan 5 hónapos (± 1 hét) korú mangalica sertésen végeztük a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar Üllői Tangazdaságában. Az állatokat 4 csoportban, istállóban tartottuk hagyományos módon. A takarmány és ivóvíz ad libitum állt rendelkezésre. Takarmányozásuk növendéksertés-táppal történt. Az istállók egy fedett helyiségből és egy nagyobb kifutóból álltak. A kísérlet állatfázisa novemberben történt, így a hőmérséklet, páratartalom a hónapnak megfelelően alakult. Hét napos akklimatizáció után az állatokat 8 napon keresztül a takarmányba keverten kezeltük 12,5 mg doxiciklin/ttkg adagban a vizsgált készítménnyel (Ladoxyn 10% granulátum, gyártási szám: 457095, Lavet Gyógyszergyártó Kft., Magyarország). A kezelés időtartama alatt alkalmazott dózis ($8 \times 12,5 \text{ mg} = 100 \text{ mg/ttkg}$) megegyezett az előző kísérletben alkalmazott dózissal ($5 \times 20 \text{ mg} = 100 \text{ mg/ttkg}$). A kezelés megkezdése előtt kontroll trágyamintákat vettünk. Mivel az állatokat alom nélkül tartották, így a trágya nem tartalmazott sem szalmát, sem egyéb alományanyagokat. A keletkezett trágya összegyűjtése a kezelés időtartama alatt naponta történt, és a trágya érlelését a telepi gyakorlatnak megfelelően kazlas tárolással végeztük a szabad ég alatt. A tárolás körülményeit ennek megfelelően befolyásolták az aktuális környezeti viszonyok is. Mivel a vizsgálatra késő ősszel került sor, illetve azt követte a mintavétel november végétől, február elejéig a hőmérséklet általában $0-12^\circ\text{C}$ értékek között alakult (maximum-minimum értékek: 15°C és -3°C), viszonylag magas (becsült) páratartalom mellett. Az említett érlelési időszakban a hőmérséklet a hazánkban szokásoshoz képest magasabban alakult. Csak néhány fagyos nap (0°C alatti hőmérséklet) volt a mintavételi periódus alatt. A napsütéses órák száma a sokéves átlaghoz képest alig magasabban alakult. A kezelés befejezését követően a trágyahalomból mintát vettünk, majd további mintavételekre került sor az érlelés alatt az 1., 2., 3., 6., 8., 10. és 12. héten is. Valamennyi mintavételi időpontban 3-3 párhuzamos mintát vettünk. Minden mintavételi időpontban a trágyahalom három különböző pontjából vettünk 3-3 almintát és ezeket kevertük össze egy-egy edényben, így egy edénybe kb. 300 g minta került. Ezeket újra szétosztottuk $3 \times 100 \text{ g}$ -os almintára. Ezekből a 100 g-os mintákból határoztuk meg a doxiciklin koncentrációját. A mintákat a feldolgozásig -30°C -on tároltuk.

5.1.3. Doxiciklin kimutatása trágyamintákból

A vizsgálatokat a SZIE ÁOTK Élelmiszer-higiéniai Tanszékének Élelmiszer-toxikológiai Laboratóriumában végeztük. Ennek során a doxiciklin különböző biológiai mátrixokból (vérplazma, máj, vese, bőr-zsír, izom, stb.) történő folyadékkromatográfiás analizésére a tanszéken kifejlesztett vizsgálati módszert adaptáltuk és validáltuk a vegyületnek a trágyamintákból való kimutatására. A hatóanyag mennyiségi meghatározása a trágyamintákból szilárd fázisú extrakcióval (Solid Phase Extraction – SPE), illetve azt követő fordított fázisú, nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiás (reverse-phase high performance liquid chromatographic method – RP-HPLC) módszerrel történt.

5.1.3.1. Felhasznált vegyszerek és eszközök

A minta előkészítéséhez, valamint az analitikai vizsgálathoz a következő eszközöket, vegyületeket és analitikai standardokat használtuk:

- Doxiciklin-hiklát standard (Chemical Reference Standards - CRS), European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) of the Council of Europe, Lot. No: 3i, tisztaság: 856,0 µg bázis/mg.
- Metanol (MeOH), analitikai tisztaságú, Lichrosolv, Merck (Budapest, Magyarország)
- Acetonitril (ACN), HPLC gradiens tisztaságú, Lichrosolv, Merck (Budapest, Hungary)
- Oxálsav-dihidrát, analitikai tisztaságú, American Chemical Society (ACS), International Organisation for Standardisation (ISO), Merck (Budapest, Hungary)
- Víz: bidesztillált víz (teljesíti a Ph. Eur. (Aqua Purificata) követelményeit).
- Rázógép (Janke & Kunkel, IKA-WERK, KS 501D, Senselectro, Budapest, Magyarország).
- Centrifuga ((Heraeus, Biofuge primoR, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Németország).
- Szűrőpapír (Albet 400, 38-43 µm).
- SPE oszlop: Sep-Pak C18 (Waters, Milford, USA, 360 mg, 0,7 mL).
- Rotációs bepárló (Büchi R-124, vákuumszabályzó B-721, vízfürdő B-481).
- Vortex-keverő (Velp Scientifica, Spektrum 3D Kft., Budapest, Magyarország).
- Ultrahangos tisztító (RS-57F, Realtrade Kft., Budapest, Magyarország)
- HPLC berendezés (Merck LaChrom rendszer: L-7100 HPLC pumpa, L-7612 gáztalanító, L-7200 automata mintaadagoló, L-7455 DAD detektor, L-7000 interface, Tokyo, Japán)

- Kromatográfias oszlop (BST Rutin 10 RP (reverse phase) C₁₈ (030905), 250mm x 4 mm, Bio Separation Technologies - BST, Budapest, Magyarország).

5.1.3.2. Mintaelőkészítés és HPLC-mérés

A mintaelőkészítés során 2,5 g trágyához hozzáadtunk 10 ml 0,02 M oxálsavat (pH 1,53), majd ezt követően a mintát 5 percig ultrahangos vízfürdőben kezeltük és 30 perc rázatás (200/min, 25°C) után, 8500 fordulattal 10 percig centrifugáltuk. Ezt követően az oldatot megszürtük, majd az egész eljárást megismételtük. A két szűrlet egyesítése után a mintát a továbbiakban Sep-Pak C18 oszlopon (2 ml MeOH-lal és 4 ml 0,02 M oxálsavval kondicionálva) nyomtuk át 20 ml-es fecskendővel. Az oszlopot 1 ml bidesztillált vízzel és 1 ml 0,02 M oxálsav oldattal (pH 1,53) mostuk át. Levegővel történő szárítást követően 10 ml, 0,01 M, oxálsavat tartalmazó metanollal oldottuk le a mintát.

A bepárlás 45-50°C-on rotációs vákuum bepárlással történt (50 mbar, 120 1/perc). Az így kapott száraz maradékot 500 µl eluensben (HPLC mobil fázis) oldottuk fel. Az oldatot vortexkeverés és 2 perces ultrahangos tisztítás után eppendorf csőbe szedtük át és centrifugáltuk 8500 1/perc-en 10 percig.

Ezt követően a trágyaminták doxiciklin koncentrációját RP-HPLC módszerrel határoztuk meg, Merck-Hitachi LaChrome kromatográfival, BST Rutin 10 RP (reverse phase) C18, 250mm x 4 mm-es oszlopon, 345 nm hullámhosszon, UV-DAD detektorral. A mozgófázis 25 v/v% acetonitrilt, 10 v/v% metanolt és 65 v/v% 0,02M oxálsav oldatot tartalmazott (pH 1,73). Az oszlop és a minta hőmérséklete 25 °C volt, az injektálási térfogat 25 µl, az áramlási sebesség pedig 1,0 ml/perc volt. A kromatográfias mérés során izokratikus (folyamatos) elválasztást alkalmaztunk, 17 perc mérési idővel.

5.1.4. Doxiciklin koncentrációjának meghatározása

Az előbbieknél megfelelően a doxiciklin meghatározása két lépésben történt: doxiciklin extrakciója trágyából szilárd fázisú extrakcióval Sep-Pak C18 cartridge segítségével, majd az ezt követő fordított fázisú HPLC-s elválasztás és meghatározás DAD/UV érzékelő (detektor) használatával.

A minőségi meghatározás alapja a retenciós idő. A trágyaminták esetén a doxiciklin standard retenciós idejétől való eltérés nem haladhatja meg a $\pm 3\%$ -ot. A kontroll mintában a doxiciklin retenciós idejénél nem jelenhet meg csúcs.

A mennyiségi meghatározás a doxiciklinnel kevert, kezeletlen modellminták mérési eredményeiből számított kalibrációs egyenes alapján történt. A kalibrációs egyenest az alábbi összefüggés írja le: $Y = aX + b$, ahol Y a csúcsmagasság, X pedig a doxiciklin koncentrációja.

A doxiciklin koncentrációját a következő egyenlettel számoltuk ki:

$$C_x = \frac{H_x - A_0}{A_1}$$

ahol,

C_x : doxiciklin koncentrációja trágyamintákban ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

H_x : doxiciklin csúcsmagassága trágyamintákban (integrációs egység)

A_1 : érzékenység, a trágyaminták kalibrációs egyenesének meredeksége (integrációs egység $\times \mu\text{g}/\text{kg}$)

A_0 : a doxiciklinnel kevert, kezeletlen minták által adott kalibrációs egyenes metszéspontja (amikor $X=0$, integrációs egység)

A HPLC rendszer által felkínált lehetőségek közül a kalibrációs egyenes metszéspontját nullának választottuk, $A_0 = 0$.

5.1.5. A módszer validálása

Az analitikai módszer validálását az EMEA vonatkozó szakmai irányelvei (CVMP/VICH/590/98 and CVMP/VICH/591/98) alapján végeztük (CVMP, 1999a, CVMP, 1999b). A validáláshoz kezeletlen (doxiciklint nem tartalmazó) trágyamintákat használtunk. 11,7 mg doxiciklin standardhoz 100 ml 0,2 M oxálsav oldatot adva készítettünk egy törzsoldatot. Ezt a törzsoldatot hígítottuk tovább az eluenssel a kívánt koncentrációra,

amelyet a szükséges mennyiségben adtunk hozzá az antibiotikumot nem tartalmazó trágyamintához, majd 30 percig rázattuk rázógépen. Az elkészített standard oldatok koncentrációi a következők voltak: 20, 10, 5, 2, 1, 0,5 és 0,2 µg/ml. A doxiciklintől mentes trágyamintákhoz hígított doxiciklin oldatot adtunk és 30 perc rázatással homogenizáltuk. Az így kapott különböző mennyiségű doxiciklinnel kevert („spikolt”) trágyamintákat használtuk a validálás során.

5.1.5.1. Specifikusság

A módszer specifikusságát hatóanyagot nem tartalmazó, ún. „blank” minták használatával igazoltuk. Minden egyes mérési sornál „blank” mintákat is mértünk, hogy bizonyítsuk a doxiciklin retenciós idejénél nem jelentkezik mérhető érték. A kezeletlen trágyaminták kromatogramjai alapján megállapítottuk, hogy nem volt interferencia a mátrixszal és a kontroll mintáknál kapott jel kisebbnek bizonyult, mint a kimutathatósági határérték (LOD).

A mérés specifikusságát emellett a standard és a doxiciklinnel kevert mintákban mért csúcshoz tartozó spektrumok segítségével, a csúcstisztasággal, valamint LC/MS (liquid chromatography/ mass spectrometry – folyadékkromatográfiás/tömegspektrometriás) mérésekkel is megerősítettük. A csúcstisztaság (peak purity) 0,9667 volt.

5.1.5.2. Linearitás

A linearitás vizsgálatakor 2,5 g kontroll trágyához különböző koncentrációjú doxiciklin törzsoldatot adtunk öt különböző koncentrációban: 200, 500, 1000, 2000, 5000 µg/kg. Az adatokat a legkisebb négyzetek módszerével értékeltük. A lineáris regressziós egyenlet a $y=2,2173x$, a korrelációs együttható 0,9985 volt. Kisebb koncentrációk esetén a megnövekedett hiba miatt az egyenes illesztése bizonytalanabb, viszont ha az egyenest az origóba kényszerítjük, így kisebb koncentrációk esetén kisebb torzítatlansággal határozhatjuk meg a minta koncentrációját. Az elvégzett regresszió analízis adatai szerint az egyenes tengelymetszete 99,5%-os valószínűséggel nem különbözik zérótól. A kapott eredmények alapján a módszer a vizsgált tartományban lineárisnak tekinthető.

5.1.5.3. Visszanyerés

A visszanyerés meghatározásához 500, 1000, valamint 2000 µg/kg koncentrációjú doxiciklinnel kevert mintákat használtunk. A visszanyerés ezen trágyaminták és az azonos koncentrációjú standard (kalibrációs) oldatok csúcsmagasságának hányadosa. Az eredményeket a Melléklet M/1. táblázatában mutatjuk be. A visszanyerés átlaga minden koncentrációnál > 50%, ami az irodalmi adatokat figyelembe véve megfelelőnek tekinthető (Boxall et al, 2005, Loke et al, 2003).

5.1.5.4. Laboratóriumon belüli ismételtetés és pontosság

A precizitás meghatározásának egyik hasznos eszköze a relatív szórás vagy variációs koefficiens ($CV=SD/átlagérték$, vagy $CV\%=100 \times SD/átlag$). Az átlagérték pontosságát a mért koncentrációk átlagának és az elméleti koncentrációknak százalékos különbségével határoztuk meg. A laboratóriumon belüli ismételtetés és pontosság vizsgálatára adott mennyiségű doxiciklinnel kevert trágyamintákat használtunk. Az alkalmazott koncentrációk a következők voltak: 500, 100 és 2000 µg/kg. A mért koncentrációk (amelyeket a doxiciklinnel kevert trágyaminták kalibrációja segítségével határoztunk meg) és a doxiciklin koncentrációk átlaga alapján az általunk kapott variációs koefficiens ($CV\%$) értéke 1,6-8,4 és a pontosság értéke (-)4,0 – (-)25,1 volt, igazolva a módszer megfelelő ismételtetését és pontosságát (Sunderland et al, 2003, Winckler és Grafe, 2001).

5.1.5.5. Kimutatási (LOD) és mennyiségi (LOQ) meghatározási határ

Vizsgálataink során a trágya doxiciklin tartalmának kimutatási és mennyiségi meghatározási határértékét az ún. jel/zaj arány alapján határoztuk meg.

A kimutatási, illetve a mennyiségi határt az alábbi összefüggéssel határoztuk meg:

$$LOD = \frac{3 \cdot N}{A_1} \qquad LOQ = \frac{10 \cdot N}{A_1}$$

ahol,

N: a zaj értéke

A₁: a doxiciklinnel kevert, kezeletlen trágyaminták kalibrációs egyenesének meredeksége

A meghatározás során kapott LOD és LOQ értékek 13,5 µg/kg, illetve 45,1 µg/kg voltak.

5.1.5.6. Stabilitás

A stabilitási vizsgálatokhoz 5000 µg/kg koncentrációban doxiciklint tartalmazó trágyamintát készítettünk, amelyet -30°C-on 46 napig tároltunk. A mérések alapján ezen a hőmérsékleten -1,1% hatóanyag-csökkenést tapasztaltunk a vizsgálat időtartama alatt. A mérések eredményeit a Melléklet M/3. táblázataiban mutatjuk be.

Az eredmények alapján megállapítható, hogy a minta tárolása során bekövetkezett változás mértéke (-1,1%) megfelel a követelményeknek (± 5%) (Kühne et al, 2000).

5.1.6. A felezési idő meghatározása

A legtöbb esetben a szerves eredetű szennyező anyagok elsőrendű kinetikát követnek lebomlásuk során (Bao et al. 2009), így a doxiciklin lebomlását az alábbi egyenlettel írhatjuk le:

$$y = a(1 - e^{-kt})$$

ahol, e az Euler féle szám (a természetes logaritmus alapja, $e \approx 2,71828182845904523536$), k az eliminációs konstans, y a különbség a kiindulási koncentráció (C_0) és a t idő elteltével mutatott koncentráció (C_t) között, illetve az $a = C_0$. Ezért az egyenlet az alábbi módon is felírható:

$$C_0 - C_t = C_0(1 - e^{-kt}) = C_0 - C_t = C_0 - C_0 e^{-kt}$$

azaz,

$$C_t = C_0 e^{-kt}$$

Mivel a felezési idő azt az időtartamot adja meg, amely alatt a kezdeti érték felére csökken, ez a fenti képlet alapján a következőképp számolható:

$$C_{t_{1/2}} = C_0 e^{-kt_{1/2}}$$

ahol $t_{1/2}$ a felezési időt jelöli, ezt a következő lépéseken, illetve átalakításokon keresztül tudjuk kifejezni az egyenletből:

$$C_{t_{1/2}} / C_0 = e^{-kt_{1/2}}$$

Mivel a kiindulási koncentráció a felére csökkent:

$$0,5 = e^{-kt_{1/2}}$$

azaz,

$$-\ln 0,5 = kt_{1/2}$$

Mivel $-\ln 0,5 = \ln 2$

$$\ln 2 / k = t_{1/2}$$

Tehát, a doxiciklin felezési ideje komposztált trágyában az alábbi képlet alapján határozható meg:

$$t_{1/2} = -\ln 2 / k$$

A k értékét Excel táblázatkezelő program segítségével határoztuk meg. Első lépésként kiszámítottuk minden egyes átlagos koncentráció természetes alapú logaritmusát és ezeket az értékeket ábráztuk a mintavételi időpontok függvényében. A kapott diagrammon trendvonalat vettünk fel, amelynek meredeksége adta meg a k értéket. Ezután a $t_{1/2} = -\ln 2 / k$ képletbe behelyettesítve az eliminációs konstans kapott értékét megkaptuk a keresett felezési időt.

5.2. Doxiciklin lebomlása talajban

5.2.1. Kísérleti elrendezés

A jelen vizsgálat a korábban ismertetett trágyaérleléses kísérlet folytatása, amely a SZIE ÁOTK Üllői tangazdaságában (Dóra Majorban) történt a telepi trágyaérleléses vizsgálat után, annak folytatásaként. A trágyát a szántóföldre március elején juttattuk ki, így a mintavételi időszak március elejétől július végéig tartott. Márciusban és áprilisban enyhe tavaszi idő volt, alig ingadozó hőmérsékletekkel (10-22°C között). A május változékony volt, hideg és meleg periódusok váltották egymást (minimum-maximum: 10°C-30°C). A június forró volt, csak a végére enyhült meg. Július második felétől a forróság rekordokat döntött, néha még éjjel sem ment 25 fok alá a hőmérséklet. Márciusban kevés eső esett és április gyakorlatilag teljesen száraz volt. A május, június és július viszont meglehetősen csapadékos.

A doxiciklinnel kezelt 20 sertéstől származó trágyát a 12 hetes érlelési, komposztálási időszakot követően egy kukoricatermesztésre használt mezőgazdasági földterületre juttattuk ki, majd ezt követően a kiszórt trágya beszántásra került (kb. 0-45 cm-es mélységbe). A 9. táblázat a talaj fizikai-kémiai paramétereit tartalmazza. A feltüntetett adatok a Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Környezettudományi Intézet (Gödöllő) laboratóriumának méréseiből származnak.

A doxiciklin-tartalmú trágya kijuttatása előtt kontroll mintát vettünk a talajból, majd közvetlenül a beszántás után és azt követően a 2., a 4., a 8., a 14. és a 20. héten további mintákat gyűjtöttük a már trágyázott talajból. A talajminták a talaj három különböző szintjéről származtak: a talaj felszínéről (0-5 cm), valamint 20-25 és 45-50 cm-es mélységből. A kukoricaföld 3 különböző pontjáról történt a mintavétel, majd ezeket az egyedi mintákat egyesítettük. Minden egyes mintavételi időpontban 3-3 párhuzamos minta vételére került sor.

Valamennyi mintavételi időpontban 3-3 párhuzamos mintát vettünk. Minden mintavételi időpontban a talaj felszínéről és a 20-25 és 45-50 cm-es mélységből vettünk mintákat. Minden egyes mélységben a földterület három különböző véletlenszerűen kiválasztott pontjából vettünk 3-3 almintát és ezeket kevertük össze egy-egy edényben, így egy edénybe kb. 300 g minta került. Ezeket újra szétosztottuk 3*100 g-os almintára. Ezekből a 100 g-os mintákból határoztuk meg a doxiciklin koncentrációját.

9. táblázat A doxiciklin talajban való lebomlásának vizsgálatában használt talaj jellemzése, fontosabb adatai

Talaj jellemzése	
Talaj típusa	Humuszos homoktalaj
Talaj textúrája	Homok
Fizikai féleség	Homok/durva homok
<u>Vizsgált tényező</u>	<u>Érték</u>
<u>Alapvizsgálati adatok</u>	
pH_{H2O}	7,35
pH_{KCl}	6,95
CaCO₃ (%)	nyomokban
Humusz (%)	1,26
Kötöttség (K_A)	27
Higroszkóposság (hy₁)	0,332
Homok (%)	89,2
Iszap (%)	8,0
Agyag (%)	2,8
Szemcseösszetétel (%)	
0,25-2,00 mm	78,05
0,05-0,25 mm	11,15
0,02-0,05 mm	3,72
0,01-0,02 mm	0,47
0,005-0,01 mm	3,30
0,002-0,005 mm	0,53
<0,002 mm	2,80
Kationcsere kapacitás (mgeé/100 g száraz tömeg)	9,5
Kicserélhető Ca (mgeé/100 g száraz tömeg)	1,8
Kicserélhető Mg (mgeé/100 g száraz tömeg)	0,9
Kicserélhető K (mgeé/100 g száraz tömeg)	0,5
Kicserélhető Na (mgeé/100 g száraz tömeg)	0,1
<u>Kiegészítő adatok</u>	
Vízkapacitás (%)	25,8
C_{org} (%)	0,63
Összes nitrogén (%)	0,07
Aktuális víztartalom (%)	10,6

5.2.2. Laboratóriumi analízis

A talajminták doxiciklin koncentrációját vizsgáltuk. A doxiciklin meghatározása szilárd fázisú extrakcióval, majd ezt követően nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás eljárással történt. A kimutatáshoz használt módszer a Hamscher et al. (2002) által kifejlesztett eljárás alapján, amely nem azonos a doxiciklin trágyából történő kimutatásakor alkalmazott HPLC-módszerrel. A talaj doxiciklin tartalmának meghatározására használt módszer mintaelőkészítésének és a validálásának legfontosabb elemeit, illetve a Hamscher et al. (2002) által kifejlesztett módszertől való eltéréseket az alábbiakban ismertetjük.

5.2.3. Felhasznált vegyszerek és eszközök

A minta előkészítéséhez, valamint az analitikai vizsgálathoz a következő eszközöket, vegyületeket és analitikai standardokat használtuk:

- Doxiciklin-hiklát standard (Chemical Reference Standards - CRS), European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) of the Council of Europe, Lot. No: 3i, tisztaság: 856,0 µg bázis/mg.
- Citrát puffer: Na₂HPO₄, K38870080 Guaranteed Reagent (GR), Merck (Budapest, Magyarország); Citromsav PP/2008/01380/0 Guaranteed Reagent (GR), Reanal Kft. (Budapest, Magyarország); EDTA nátrium só 90482 analitikai tisztaságú, American Chemical Society (ACS), Scharlau (Debrecen, Magyarország).
- Etil acetát, KBM58146 analitikai tisztaságú, Reanal Kft. (Budapest, Magyarország).
- Hangyasav, tisztaság: 98-100% 12192, Guaranteed Reagent (GR) Reanal Kft., (Budapest, Magyarország).
- Ammónium acetát, 89072278, analitikai tisztaságú Reanal Kft. (Budapest, Magyarország)
- Acetonitril (ACN), HPLC gradiens tisztaságú, Lichrosolv, Merck (Budapest, Magyarország)
- Víz: bidesztillált víz (teljesíti a Ph. Eur. (Aqua Purificata) követelményeit).
- Rázógép (Janke & Kunkel, IKA-WERK, KS 501D, Senselectro, Budapest, Magyarország).
- Centrifuga ((Heraeus, Biofuge primoR, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Németország).
- SPE oszlop: Sep-Pak C18 (Waters, Milford, USA, 360 mg, 0,7 mL).
- Rotációs bepárló (Büchi R-124, vákuumszabályzó B-721, vízfürdő B-481).

- Vortex-keverő (Velp Scientifica, Spektrum 3D Kft., Budapest, Magyarország).
- HPLC berendezés (Merck LaChrom rendszer: L-7100 HPLC pumpa, L-7612 gáztalanító, L-7200 automata mintaadagoló, L-7455 DAD detektor, L-7000 interface, Tokyo, Japán)
- Kromatográfias oszlop (Phenomex Luna 5 μ PFP- Pentafluorophenyl (2) 100A 250mm x 4,6 mm, Gen-Lab Kft., Budapest, Magyarország).

5.2.4. Mintaelőkészítés

A meghatározáshoz használt 2,5 g talajmintát (melyet a felhasználásig lezárt edényben lefagyasztva, -30°C-on tároltunk, majd szobahőmérsékleten kiolvastottunk) 3 ml citrát pufferrel (pH 4,7) és 15 ml etil-acetáttal vortex-keverőben összekevertük és 15 percig rázattuk (200/min, 25°C), majd 10 percig 8500 fordulaton centrifugáltuk. A teljes eljárást újra megismételtük és az így kapott két extraktumot egyesítettük. A bepárlás 40°C-on, vákuum alatt történt, majd a bepárolt anyagot feloldottuk 500 μ l „A” eluensben, mely 0,5% bidesztillált vízben oldott hangyasavat és 1 mM ammónium-acetát oldatot (pH 2,5) tartalmazott. A „B” mobil fázis acetonitril volt.

A kromatográfias meghatározást egy Merck-Hitachi LaChrom HPLC-n végeztük. Az áramlási sebesség: 1ml/perc, a detektálási hullámhossz 345 nm, az injektálási térfogat 50 μ l volt. A mérés során gradiens elúciót használtunk. A detektálás során a mozgó fázis összetétele a következők szerint változott: 75-50% „A” eluens és 25-50% „B” eluens az első 9 percben, és ezt követően további 1 percig 1% „A” eluens és 99% „B” eluens, és végül visszatértünk a 75:25%-os arányra.

5.2.5. Validálás

5.2.5.1. Specifikusság

A módszer specifikusságát hatóanyagot nem tartalmazó, ún. „blank” minták használatával igazoltuk. Minden egyes mérési sornál „blank” mintákat is mértünk azért, hogy bizonyítsuk: a doxiciklin retenciós idejénél nem jelentkezik mérhető érték. A kezeletlen talajminták kromatogramjai alapján kijelenthetjük, hogy nem volt interferencia a mátrixszal és a kontroll mintáknál kapott jel kisebbnek bizonyult, mint a kimutathatósági határérték (LOD).

5.2.5.2. Linearitás

A doxiciklin standard oldat linearitásának ellenőrzésére 7 pontos kalibrációt készítettünk a 0,2-20,0 µg/ml koncentráció tartományban.

A törzsoldat (100,5 µg/ml) elkészítéséhez 11.7 mg doxiciklin-hiklátot oldottunk fel „A” eluensben. Az alap törzsoldatból további, különböző koncentrációjú oldatokat készítettünk. A hígításhoz az „A” mobil fázist használtuk. Az elkészített standard oldatok koncentrációi a következők voltak: 20, 10, 5, 2, 1, 0,5 és 0,2 µg/ml.

A doxiciklin linearitását különböző doxiciklinnel kevert („spikolt”) talajminták segítségével határoztuk meg. A modell-kalibráció során 2,5 g talajmintához 60 µl különböző koncentrációjú törzsoldatot adtunk, így az alábbi koncentrációkat kaptuk: 593, 237, 119, 59 és 30 µg/kg. Az adatokat a legkisebb négyzetek módszerével értékeltük. A lineáris regressziós egyenletek a következők voltak: $y=37560x$ (standard oldatok) és $y=2757x$ (doxiciklinnel kevert talajminták).

A kalibrációs görbe lineárisnak bizonyult mind a standard oldat esetében vizsgált 0,2-20 µg/ml ($r=0,999$), mind a 30-593 µg/kg ($r=0,999$) doxiciklinnel kevert talaj koncentrációs tartományban. Az eredmények alapján az összefüggés a paraméterek között a vizsgált tartományban lineárisnak tekinthető.

5.2.5.3. Visszanyerés

A visszanyerés meghatározására 30, 59, valamint 119 µg/kg koncentrációjú doxiciklinnel kevert mintákat használtunk. Mindhárom koncentrációban hat mérést végeztünk. A visszanyerés az említett talajminták és az azonos koncentrációjú standard (kalibrációs) oldatok csúcsmagasságának hányadosa, de a visszanyerés értékének meghatározásához szükséges a standard oldatokkal való kalibráció egyenese is. A visszanyerésre a következő átlagértékeket (\pm szórás) kaptuk: 88,6 ($\pm 29,0$), 75,8 ($\pm 12,4$) és 66,9 ($\pm 8,0$). A visszanyerés átlaga minden koncentrációnál megfelelőnek tekinthető (Blackwell et al, 2004, Blackwell et al, 2007, Boxall et al, 2005).

5.2.5.4. Kimutatási (LOD) és mennyiségi (LOQ) meghatározási határ

A kimutatási határt (LOD) és a mennyiségi meghatározási határt (LOQ) a jel-zaj arány alapján határoztuk meg az alábbi egyenletek szerint:

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot N}{A_1} \qquad \text{LOQ} = \frac{10 \cdot N}{A_1}$$

ahol,

N: a zaj értéke

A₁: a doxiciklinnel kevert, kezeletlen talajminták kalibrációs egyenesének meredeksége

A kimutatási határ (LOD), illetve a mennyiségi meghatározási határ (LOQ) a talajmintákban 7.5 és 25.0 µg/kg értéknek bizonyult.

A talaj felszínéről vett kontroll talajminta, a doxiciklinnel kevert talajminta és a trágyázott talajból a beszántást követően a 0., 14. és 20. héten vett talajminták reprezentatív kromatogramjai a Mellékletek ábráin láthatók.

A felezési idő meghatározása a trágya vizsgálatánál leírt módon történt, így annak részletezésétől itt eltekintünk.

5.3. Nitrogén transzformációs vizsgálat

5.3.1. Kísérleti elrendezés

A nitrogén transzformációs vizsgálatot az OECD 216 sz. irányelve szerint végeztük. A végrehajtás során ugyanakkor figyelembe vettük Roberts et al. (2002) által publikált módszert is. Az irányelv egy olyan módszert ír le, melynek célja, hogy hosszú távon vizsgálja egy kémiai anyag hatását a talajlakó mikroorganizmusok nitrogén transzformációjára.

A nitrogén transzformációs teszt az állatgyógyászati készítmények környezettoxikológiai értékeléséhez kötelezően előírt vizsgálat. Eredményének értékelése azon alapul, hogy a kísérlet 28. napján a vizsgált anyag milyen mértékben csökkenti a nitrogén transzformáció mértéket. Amennyiben a csökkenés >25% az antibiotikumot nem tartalmazó kontroll mintákhoz viszonyítva, az biológiailag jelentősnek tekintendő. A teszt ugyanakkor nem vizsgálja a hatás kialakulásának hátterében álló változásokat. A nitrátképződés a szén-nitrogén kötések bontása után történik. Így a teszt a vizsgált anyag talaj mikroorganizmusok által való szén transzformációra gyakorolt hatására is utal. Például ha a nitráttermelés a kezelt és kontroll talajmintákban azonos ütemű, nagyon valószínű, hogy a fő szénbontó biokémiai utak is érintetlenül működnek. A nitrogén transzformációja, a talajban zajló fontos folyamat, amely során mikroorganizmusok hatására ammónia és nitrát képződik (nitrifikáció). A vizsgálat során ez utóbbit, azaz a keletkező nitrát koncentrációját határoztuk meg.

A kísérletben használt talaj ugyanarról a mezőgazdasági területről származott, amelyen a korábban említett talajlebomlási vizsgálatokat végeztük. Természetesen a talaj sem korábbi trágyázásban, sem egyéb jellegű kezelésben nem részesült, azért hogy a vizsgálat eredményét egy esetlegesen jelen levő növényvédő szer, vagy egyéb anyag ne befolyásolja. A terület véletlenszerűen kiválasztott több pontjáról (0-30 cm-es mélységből) gyűjtött talajt alaposan összekevertük és a továbbiakban ezt a kb. 8,5 kg talajelegyet használtuk. Hat polietilén vödörbe (2 l) egy-egy kg talajt mértünk be közvetlenül a begyűjtés után és minden egyes talajtételhez hozzáadtunk és alaposan elkevertünk lucerna lisztet 5 g/kg talaj mennyiségben, amely szerves tápanyagként szolgált a mikroorganizmusok számára. A doxiciklint desztillált vízben oldva, 5 különböző mennyiségben adtuk hozzá a vödrökbe bemért egyes talajmintákhoz a következők szerint: 25, 50, 100, 200, 400 µg/kg, majd alaposan átkevertük. A 6. vödör az kezeletlen kontrollként szolgált. A fenti koncentrációkat az előbbieken leírt saját kísérletünk eredményei alapján választottuk ki, ahol a trágyázást követően a doxiciklin koncentrációja 0,17-0,25 mg/kg volt és ez a mennyiség 20 hét alatt 0,03-0,06 mg/kg-ra csökkent. A választott koncentrációkkal ebben a tartományban kívántuk tanulmányozni a mikroorganizmusok nitrogéntranszformációjára kifejtett hatást. Minden

egyres tartályt perforált fóliával fedtünk le, hogy elkerüljük az anaerob viszonyok kialakulását. A talajminták inkubációját szobahőmérsékleten (20 ± 2 °C), sötétben, 28 napig végeztük. A talaj nedvességtartalmát, amennyiben a kétnaponta végzett mérések során eltérést tapasztaltunk a kezdeti tömeg értékéhez képest, a kísérlet alatt desztillált vízzel pótoltuk.

A talajok doxiciklinnel történő kezelése előtt (0. nap), majd azt követően a 7. a 14. és a 28. napon vettünk 10-10 g, 3-3 párhuzamos talajmintát. Minden egyes mintához 50 ml 0,1M KCl oldatot adtunk és 1 óráig rázattuk (15/min, 25°C). Szűrés után az extraktumokat -20 °C-on tároltuk a nitráttartalom meghatározásáig.

A nitráttartalom tényleges meghatározása a talajmintákból az ISO/TS 14256-1 módszer (2003) szerint történt. Ennek első és egyik legfontosabb lépése a nitrát redukálása nitritté. Ezt egy úgynevezett redukáló oszlopon hajtottuk végre, amely rezegett kadmiumot tartalmazott (2. ábra). A következő lépésben a nitritből egy diazo vegyületet képeztünk savas környezetben szulfanilamid és α -naftilamin (Griess-Ilosvay reagens) hozzáadásával. Végül, a nitrit- és közvetve a nitrátkoncentrációt spektrofotometriásan, 543 nm hullámhosszon határoztuk meg. Az abszorbancia méréshez 1x1cm-es üveg küvettát használtunk.

5.3.2. Felhasznált anyagok és eszközök

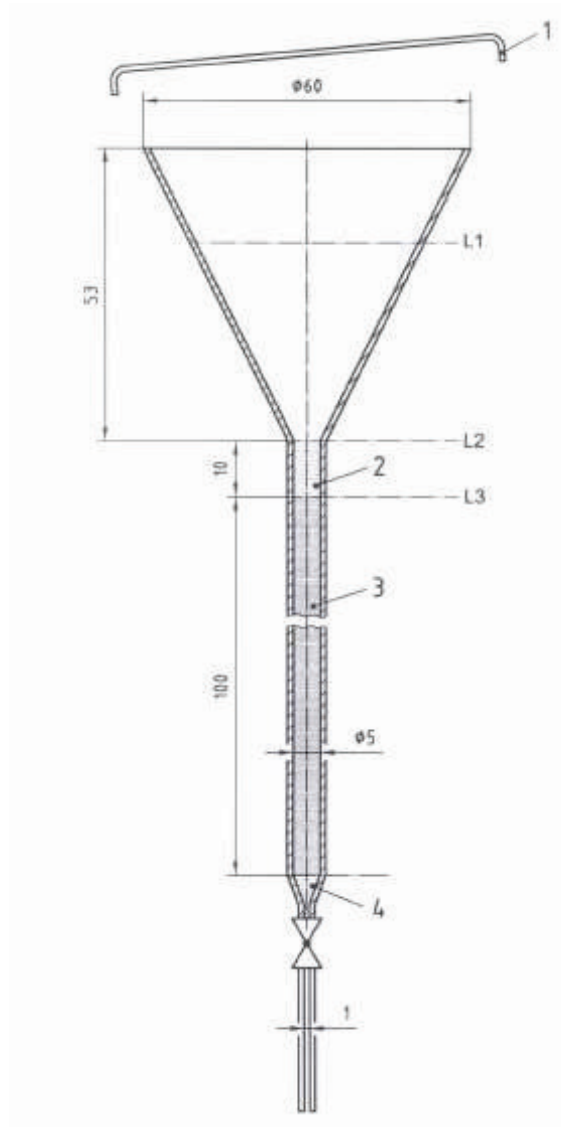
- Desztillált víz (teljesíti a Ph. Eur. (Aqua Purificata)) követelményeit, 20 °C-on max. 4,3 μ S/cm; 25 °C-on max. 5,1 μ S/cm
- Nátrium-nitrát (NaNO_3) (109.000.143, tisztaság: 99% felett, Biolab Zrt., Budapest)
- Nitrát törzsoldat: $p(\text{NO}_3\text{-N}) = 600\text{mg/l}$ (3,641 g NaNO_3 + 1 liter desztillált víz)
- Nitrát standard oldat: $p(\text{NO}_3\text{-N}) = 6\text{mg/l}$ (10 ml-t a törzsoldatból 1 literes edénybe pipettáztunk és feltöltöttük desztillált vízzel)
- Nátrium-nitrit (NaNO_2) (N363444641, tisztaság: 99% felett, Biolab Zrt., Budapest)
- Nitrit törzsoldat: $p(\text{NO}_2\text{-N}) = 600\text{mg/l}$ (2,958 g NaNO_2 + 1 liter desztillált víz)
- Nitrit standard oldat: $p(\text{NO}_2\text{-N}) = 6\text{mg/l}$ (10 ml-t a törzsoldatból 1 literes edénybe pipettáztunk és feltöltöttük desztillált vízzel)
- Ammónium-klorid (NH_4Cl) (09I040012, tisztaság: GPR Rectapur, VWR Prolabo, Franciaország)
- Ammónia oldat: $w(\text{NH}_4\text{OH}) = 6\%$ (250 ml tömény ammónia oldatot, $w(\text{NH}_4\text{OH}) = 32\%$ kb. 500 ml desztillált vízzel feloldottunk, majd kiegészítettük 1 literre)
- Ammónium-klorid puffer oldat (pH 8,7-8,8)

- Ammónium-klorid törzsoldat, $p(\text{NH}_4\text{Cl}) = 100 \text{ g/l}$ (100 g NH_4Cl -ot 0,8 liter vízben feloldottunk, beállítottuk a pH-ját ammónia oldattal és 1 literre kiegészítettük desztillált vízzel)
- Ammónium-klorid hígított puffer oldat, $p(\text{NH}_4\text{Cl}) = 10 \text{ g/l}$ (100 ml-t a törzsoldatból 1 literre kiegészítettünk desztillált vízzel)
- Durva kadmium por (0,3-0,8 mm-es szemcseméret)
- Sósav, $p(\text{HCl}) = 1,12 \text{ kg/l}$ (Z876019, GR for analysis, Merck)
- Rézszulfát ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (09/12/02/03, puriss., Spektrum-3D, Debrecen)
- Griess-Ilosvay reagens I (szulfanilamid, $\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$)
- Griess-Ilosvay reagens II (N-(1-naftil)-etiléndiamin-dihidroklorid, $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{Cl}_2$) (GIR260210022, Biolab Zrt., Budapest)
- Rázógép (Janke & Kunkel, IKA-WERK, KS 501D, Senselectro, Budapest, Magyarország)
- Spektrofotométer (Cary 50 Scan UV-VIS spektrofotométer, Varian, Ausztrália)

5.3.3. A redukciós lépés előkészítése

5.3.3.1. Revezett kadmium előkészítése

10 g kadmium porra sósavat öntöttünk, majd 10 percig kevertük. Ezután legalább 5-ször vízzel átmostuk. Az öblítés után vizet öntöttünk rá, majd hozzáadtunk 0,5 g rézszulfátot és 1 percig kevertük. Ezt követően legalább 10-szer vízzel átmostuk, hogy az összes képződött rézpelyhet eltávolítsuk. Ezt követően újra sósavval fedtük be a kadmiumport és 1 percig kevertük, majd legalább 5-ször vízzel újra átmostuk. Az így előkészített kadmium port 1 órán belül fel kell használni (addig víz alatt tartottuk).



2. ábra Redukáló oszlop sematikus rajza

- 1. tető (petri csésze)
- 2. és 4. vatta dugó
- 3. durva kadmium por
- L1: desztillált víz felső szintje
- L2: desztillált víz alsó szintje
- L3: kadmium maximális szintje

5.3.3.2. A redukáló oszlop előkészítése

A tölcser felső része kb. 60 mm átmérőjű, hossza kb. 53 mm, szára 110 mm, 5 mm-es belső átmérővel és a végén csappal. Az oszlop aljába egy vattadugót helyeztünk. Az L1 szintig feltöltöttük desztillált vízzel majd elzártuk a csapot. Beletöltöttük lassan a „rezezett”

kadmiumot, amíg annak mennyisége el nem érte az L3 szintet. Óvatos kopogtatással segítettük a kadmium betöltését a feltöltés alatt. Végül egy kis vattadugóval zártuk az oszlopot.

5.3.3.3. Színkialakítás

0,2 ml szín-reagenst adtunk minden egyes edényhez, amely a redukált folyadékot tartalmazta, majd az oldatokat alaposan összekevertük. A színreakció kialakulásához az oldatokat szobahőmérsékleten 60-90 percig állni hagytuk.

5.3.3.4. A redukáló oszlop hatékonyságának ellenőrzése

A nitrát standard oldat abszorbanciáját a nitrit standard oldat abszorbanciájával összehasonlítva megállapítottuk, hogy a különbség kevesebb volt, mint 5%. (Amennyiben ettől nagyobb különbséget tapasztalunk, a kadmiumot el kell távolítani az oszlopból és újra elő kell készíteni a vizsgálatra a korábban leírtak szerint.)

5.4. Antibiotikumok talajlakó mikroorganizmusokra kifejtett hatásainak vizsgálata a redoxpotenciál-változás mérésén keresztül

5.4.1. Talaj és antibiotikumok

A vizsgáltban öt különböző talajtípust használtunk és a doxiciklin talajlakó mikroorganizmusokra kifejtett hatását egyúttal összehasonlítottuk két más csoportba (fluoroquinolon, illetve linkozamid) tartozó hatóanyagával is.

A vizsgálatban a korábbi kísérletekben használt talaj mellett olyan talajtípusokat használtunk, amelyek főbb tulajdonságaikban eltértek egymástól. Ezek a tulajdonságok többek között a homoktartalom, a pH, a szerves széntartalom. Figyelembe vettük az OECD 106-os számú irányelvében ajánlott talajtípusokat is. Az öt különböző talajtípus főbb fiziko-kémiai paramétereinek összehasonlítása a 10. táblázatban látható. A T1 jelzésű talaj megegyezik a korábbi vizsgálatainkban használt, az Üllői tangazdaság szántóföldjéről gyűjtött talajjal. A többi talajminta. A vizsgálatban felhasznált többi talajt (T2-T5) a LAB Research Kft. bocsátotta rendelkezésünkre és a talajok jellemzői, paramétereit a Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal Növény-, Talaj- és Agrárkörnyezetvédelmi Igazgatóság által működtetett Talajvédelmi Információs és Monitoring (TIM) rendszer adott pontjain gyűjtött minták elemzéséből származtak. A mintavételeket és a vizsgálatokat az Igazgatóság végezte.

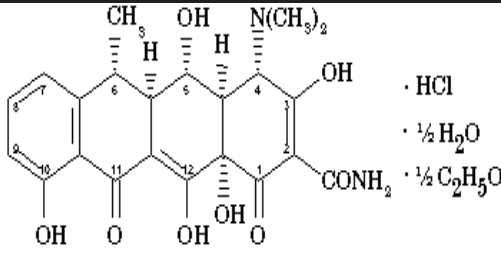
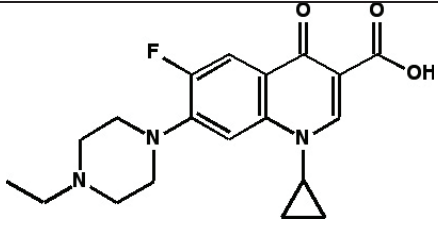
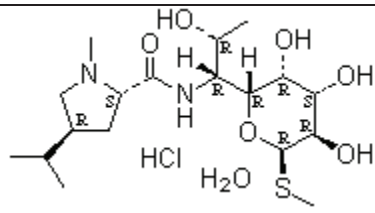
10. táblázat A vizsgálatban használt talajok jellemzői

Talaj jelölése	Talajtípus OECD Guide 106 szerint	TIM azonosító	pH (KCl)	Humusz (%)	Agyag (%)	GPS X	GPS Y	Művelési ág	Talaj textúra
T1	-	-	6,95	1,26	2,8	-	-	szántó	homok
T2	2	I2209	7,02	2,69	32,6	21°23'54"	47°21'52"	szántó	Iszapos-agyagos vályog (silty clay loam)*
T3	3	E5002	3,59	3,08	21,8	18°34'59"	46°02'47"	erdő	Iszapos vályog (silt loam)*
T4	4	E4512	3,78	5,14	15,6	19°55'14"	47°55'35"	erdő	Vályog (loam)*
T5	Vulkanikus hamu talaj (volcanic ash soil)	R1105	4,9	0,69	25,4	21°20'27"	48°10'43"	szőlő	Iszapos-agyagos vályog (silty clay loam)*

* USDA rendszer szerint

A kísérletben a következő antibakteriális szerek hatását vizsgáltuk: doxiciklin-hiklát (Yangzhou Pharmaceutical Co. Ltd.), enrofloxacin (Zhejiang Xinhua Pharmaceutical Co. Ltd.) és linkomicin-hidroklorid (Nanyang Pukang Pharmaceutical Co. Ltd.). Az antibiotikumok hatóanyagtartalma 98,6 %, 99,1% illetve 96,7% volt (11. táblázat).

11. táblázat A vizsgálatban használt antibakteriális szerek fontosabb tulajdonságai

Antibiotikum neve	Kémiai szerkezet	Molekula-tömeg (g/mol)	Batch Nr.	Tisztaság (%)
Doxiciklin-hiklát		512,94	YD0911 01070	98,6
Enrofloxacin		359,4	NA00N0 91123-B	99,1
Linkomicin-hidroklorid		461,01	2009111 491	96,7

5.4.2. A minták előkészítése és a mikrobaszám meghatározás

Az egyes talajmintákhoz hozzáadtuk az említett antibiotikumokat desztillált vízben oldva, különböző koncentrációkban. Négy koncentrációt alkalmaztunk: 200, 400, 800 és 1600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ talaj mennyiségben, valamint kontrollként antibiotikummentes desztillált vizet használtunk. Mivel a redoxpotenciál mérésen alapuló gyors módszert eddig nem alkalmazták ökotoxikológiai vizsgálatokra, a saját kísérleteinkben a talajban mért doxiciklin koncentrációknál (167,5-249,77 $\mu\text{g}/\text{kg}$) magasabb antibiotikum koncentrációkat is használtunk, hogy az esetleg csak ezekben a koncentrációkban jelentkező hatást is meg tudjuk határozni. Az antibiotikumokat tartalmazó oldatokat 25 ml-re egészítettük ki desztillált vízzel és hozzákevertük 10 g talajhoz (30 perc rázatás). Ebből a vizes talajmintákból vettünk ki egy-egy ml-t és adtuk hozzá 9 ml folyékony táptalajhoz a redoxpotenciál-változás

mértékének meghatározása céljából. Minden egyes koncentrációban, minden antibiotikum és talajtípus esetén 3-3 párhuzamos mérést végeztünk.

A redoxpotenciál mérés során az elektróda a talaj-szuszpenziót tartalmazó táplevesbe merült. Valamennyi mérésnél 1 ml talaj-szuszpenziót és 9 ml tápoldatot használtunk. A tápoldat kétszeresére hígított TSB (MERCK 105459) volt. A mérés alatt, a mikrobaszaporodás következtében, a redox-potenciál csökken. A detektációs kritérium minden mérésnél -0.8 mV/min volt.

A talaj mikrobaszámának meghatározását 10-es alapú hígítási sor készítésével, lemezöntéssel végeztük 30 °C-on. A hígító folyadék sós peptonvíz (NaCl 8,5 g/l, pepton 1 g/l), a táptalaj Plate Count agar (Merck 105463) volt.

5.4.3. Redoxpotenciál-mérésen alapuló módszer - A mérőrendszer leírása

A vizsgálatban használt módszer a mikroorganizmusok szaporodását, anyagcseréjét kísérő tápközeg redoxpotenciál változását méri, és ez lehetőséget teremt akár a minták élősejtszámának meghatározására is. A mikroorganizmusok és a közeg amelyben élnek, vagyis a környezetük redoxpotenciálja közvetlenül hatással vannak egymásra. A redoxpotenciál, tulajdonképpen a mikroorganizmusok oxigénigényét fejezi ki. A Nernst-egyenlet szerint egy megfordítható oxidációs-redukciós reakcióban a redox-potenciál E_h /:

$$E_h = E_0 + \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \cdot \ln \frac{[ox.]}{[red.]}$$

ahol, E_0 a standard redox-potenciál, amikor pH 0, és az oxidált /ox./ és redukált /red./ alak koncentrációja megegyezik,

R = az egyetemes gázállandó

T = az abszolút hőmérséklet

F = a Faraday-féle töltésmennyiség

n = a reakcióban átvitt elektronok száma (n=1).

A mikrobák szaporodásukhoz és más élettévékenységeikhez az energiát a biológiai oxidáció révén nyerik. Aerob légzés során sokkal több energiát tudnak felszabadítani, mint anaerob

erjedési folyamatokkal (Deák, 2006). A baktériumok, számos egyéb anyag mellett, az energiát elsősorban a glükóz lebontásából nyerik, amelynek fő útja a (aerob) glikolízis. Az energiát, amely nagy energiájú foszfátkötésekben (ADP, ATP) tárolódik, a mikroba részben mozgásra, bioszintézisre, transzport folyamataira használja fel, a másik része szabad hő formájában távozik.

Az élettani folyamatokhoz szükséges oxigén mennyiségétől függően a mikroorganizmusok csak adott redoxpotenciál tartományban képesek szaporodni, ennek megfelelően a redoxpotenciál változásának detektálásával nem csak a mikrobák anyagcsere-aktivitására, de akár a jellegükre (aerob, anaerob, fakultatív anaerob, aerotoleráns anaerob) is következtetni lehet. A biológiai oxidáció eredményeként a környezet redukálódása következik be, a folyamat során a közeg redoxpotenciálja folyamatosan csökken. A redoxpotenciál változás $|\Delta E_h|$ ugyanis attól függ, milyen az oxidált és redukált anyagok aránya a közegben. Tehát a csökkenés az oxigénfogyasztás és a redukáló anyagcsere-termékek felszaporodásának következménye.

A kísérletünkben alkalmazott MicroTester berendezés a mikroorganizmusok szaporodását, illetve aktivitását a környezet (tápközeg) redoxpotenciáljának mérése alapján detektálja. A mért érték változásának kiértékelése lehetőséget ad a vizsgált minták élősejtszámának vagy a mikrobák anyagcsere aktivitásának meghatározására.

A redoxpotenciál változása független a használt mérőcella alakjától, méretétől és széles körben a táptalaj összetételétől, ezért a mérés tetszőleges mennyiségű mintával, bármely folyékony tápközegben elvégezhető.

A tápközeg (tápleves) redoxpotenciál értékét a hőmérséklet ingadozása csak kismértékben befolyásolja, így pl. 1°C hőmérséklet-emelkedés tápközegtől függően 0,5-1,5 mV csökkenést eredményez, ami messze elmarad a detektációs kritériumként előírt 10 mV változástól.

A mérési eljárás alapja, hogy a baktériumok élettevékenysége (szaporodása, anyagcséréje) során az energiatermelő biológiai oxidációs reakciók eredményeként a környezetük, így a talaj redoxpotenciálja jól mérhetően csökken. Detektációs időnek (TTD) tekintjük azt az időpontot, amikor a redoxpotenciál (E, mV) változás sebességének abszolút értéke egy, a véletlen hatásoktól szignifikánsan különböző értéket meghalad (pl. $|dE/dt| \geq 1 \text{ mV/perc}$). Ez az érték az úgynevezett detektációs kritérium (Reichart et al. 2007b).

Gyakorlatilag a vizsgálatban a talaj nem azonosított fajtájú mikroba forrásként funkcionált. A dolog természetének megfelelően olyan talajmikrobát, vagy mikrobacsoportot kerestünk,

amely reagál a talajhoz adott antibiotikumokra. Azokkal a talajlakó mikroorganizmusokkal, amelyek normál táptalajon nem kitenyészthetők, nem foglalkoztunk. A talaj-szuszpenzióhoz adott tápoldat a mikroorganizmusok szaporodását segítette elő.

A módszer ebből a szempontból (és a háttér mechanizmusok jellemzése szempontjából is) elviekben hasonló az előzőekben tárgyalt nitrogén transzformációs teszthez vagy az egyéb vizsgálatokban használt, a talaj szubsztrát-indukált légzésének méréséhez, valamint a biológiai oxigénigény meghatározásához, ahol szintén nem tudjuk pontosan, milyen talajlakó mikroorganizmusok okozzák a változást és nem vizsgáljuk annak pontos mechanizmusát sem. Segítségükkel mégis jól jellemezhető egyes talajok, illetve a talajban lakó egyes mikroorganizmusok biológiai aktivitása, valamint ennek az aktivitásnak a környezeti tényezők vagy jelen esetben az antibiotikum hatására történő változása (Hollender et al., 2003, Hund-Rinke és Simon, 2002).

A kutatásban azért is esett a választás a redoxpotenciál-változás detektálására épülő módszerre, mivel ezt eddig elsősorban élelmiszerek, élelmiszeripari alapanyagok mikrobaszámának meghatározására (Jozwiak et al, 2010, Szakmár et al, 2006), illetve bizonyos mikrobiológiai identifikációs vizsgálatokra használták (Reichart et al, 2007a, Reichart et al, 2007b), és az eredmények alapján úgy gondoltuk célszerű lehet a talaj mikrobiológiai vizsgálatára is alkalmazni a módszert. Az alkalmazhatóság feltétele a jellegzetes, koncentrációfüggő, jól reprodukálható hatások mérhetősége volt.

6. Eredmények

6.1. Doxiciklin lebomlása sertéstrágyában

6.1.1. *In vitro* trágyaérlelés

A laboratóriumi vizsgálatban a doxiciklin átlagos kiindulási koncentrációja a trágyában 61,6 mg/kg volt. Az érlelés alatt az antibiotikum koncentrációja folyamatosan csökkent: 4, illetve 8 hét után a mért hatóanyag-tartalom 37,7 mg/kg-ra, illetve 32,9 mg/kg-ra mérséklődött, amely az eredeti doxiciklin koncentrációnak 54% és 42%-a. A 12. héten mért alacsony koncentráció, amely alacsonyabb, mint az utolsó héten mért érték, valószínűleg a trágya inhomogenitásának a következménye. A 16 hetes tárolási időszak végére az antibiotikum eredeti mennyisége 70 %-kal csökkent, de még ekkor is meglehetősen magas koncentrációban (20,4 mg/kg) volt jelen a doxiciklin. Tehát a közel négy és fél hónapos *in vitro* trágyaérlelést követően a doxiciklin >20 mg/kg koncentrációban volt kimutatható a sertéstrágyából. Az eredmények a 12. táblázatban láthatók.

Az eliminációs konstans (k) értéke a laboratóriumi vizsgálatban 0,0924 volt. A $t_{1/2} = -\ln 2/k$ képletbe behelyettesítve az eliminációs konstans kapott értékét megkaptuk a keresett felezési időt.

A doxiciklin felezési ideje a sertéstrágyában 52,5 nap (7,5 hét) értéknek bizonyult a laboratóriumi körülmények között elvégzett vizsgálatban.

12. táblázat Doxiciklin koncentrációja trágyamintákban laboratóriumi körülmények között történt érlelés során

Hét	1. minta (mg/kg)	2. minta (mg/kg)	3. minta (mg/kg)	Átlag ± szórás (mg/kg)
0	68,26	45,19	71,25	61,6±14,3
1	n.a.	60,36	59,65	60,0±0,50
2	52,78	57,64	n.a.	55,2±3,43
4	39,46	41,10	32,47	37,7±4,59
6	33,97	32,18	32,44	32,9±0,97
8	31,84	26,50	29,45	29,3±2,68
12	11,18	14,16	14,36	13,2±1,78
16	20,60	15,28	25,21	20,4±4,97

n.a. nincs értékelhető adat

6.1.2. Trágyaérlelés telepi körülmények között

A gazdaságban, gyakorlati körülmények között végzett vizsgálatban a kezdeti doxiciklin koncentráció (87,4 mg/kg trágya) meglehetősen magas volt. A kezdeti magas koncentráció már az első héten jelentősen csökkent és a kezdeti koncentrációnak közel a fele (43,98 mg/kg) volt már csak kimutatható a 2. héten. A mintavételi időszak 4. illetve 8. hetére a kezdeti koncentráció tovább csökkent és ekkor már csak a kiindulási érték 38,6%, illetve 16,8%-a mutatható ki, szemben az *in vitro* vizsgálatban ahol 4, illetve 8 hét után az eredeti hatóanyag-tartalom 54%, illetve 42% volt még kimutatható. A 12 hetes komposztálás végére a kiindulási doxiciklin mennyiség 89,3%-a lebomlott (13. táblázat). Ekkor a trágyamintákban mérhető doxiciklin koncentrációja 9,37 mg/kg volt.

13. táblázat Doxiciklin koncentrációjának változása a trágyamintákban a gazdaságban történt érlelés során

Hét	1. minta (mg/kg)	2. minta (mg/kg)	3. minta (mg/kg)	Átlag ± szórás (mg/kg)
0	88,12	86,07	88,32	87,50 ± 1,25
1	69,31	67,02	67,92	67,47 ± 1,15
2	50,95	53,41	27,59	43,98 ± 14,25
3	41,7	42,45	53,28	45,81 ± 6,48
4	33,84	34,27	33,33	33,81 ± 0,47
6	22,28	22,67	22,62	22,52 ± 0,21
8	21,22	9,50	13,37	14,69 ± 5,97
10	15,89	11,86	6,09	11,28 ± 4,93
12	11,18	8,26	8,67	9,37 ± 1,58

A doxiciklin felezési idejét a korábban részletezettek (5.1.6.9. és 6.1.1. fejezet) szerint, a $t_{1/2} = -\ln 2/k$ képlet alapján határoztuk meg. Az eliminációs konstans (k) értéke a gazdaságban végrehajtott kísérlet esetében 0,1885 volt.

Ezek alapján a doxiciklin felezési ideje a sertéstrágyában az állattartó telepen végrehajtott trágyaérleléses kísérletben 25,7 nap (3,68 hét) értéknek bizonyult.

6.2. Doxiciklin lebomlása mezőgazdasági talajban

A doxiciklin tartalmú trágya mezőgazdasági területre való kijuttatását követően, az antibiotikum kiindulási koncentrációja $0,25 \pm 0,03$ mg/kg volt a talaj felszíni rétegében, $0,188 \pm 0,02$ mg/kg a 20-25-cm-es mélységben és $0,168 \pm 0,02$ mg/kg az 45-50-cm-es talajrétegben. A telepi körülmények között érlelt trágya hatóánya-tartalma 9,37 mg/kg volt, azaz a talajba jutó antibiotikum koncentrációja a trágyában mérhető érték 2-2,5%-a. Négy, illetve nyolc hét után az említett kezdeti koncentrációknak 59,7% és 43,8%-a volt kimutatható a legfelső talajrétegben (0,15 mg/kg, 0,11 mg/kg). Az eredeti doxiciklin mennyiségének 75,5%-át, 0,14 mg/kg-ot találtuk 20-25-cm mélyen 8 hét után és csak a mintavételi időszak 14. hete után csökkent a koncentráció ebben a talajmélységben 33,3%-ra (0,06 mg/kg). Nyolc hét után a kiindulási antibiotikum koncentráció 57,3%-a került kimutatásra a legmélyebb vizsgált talajrétegben (45-50 cm). A mért koncentráció 0,1 mg/kg volt. A 20 hetes vizsgálati időtartam végére a doxiciklin 76,2%, 67% és 81,2%-a bomlott le a talajfelszínen, illetve 20-25 és 45-50 cm mélységben a talajban. Így a mintavételi időszak végén mérhető hatóanyag-koncentrációk a különböző talajrétegekben 0,06 mg/kg, 0,06 mg/kg és 0,03 mg/kg.

14. táblázat Doxiciklin koncentrációja felszíni talajmintákban

Hét	1. minta (mg/kg)	2. minta (mg/kg)	3. minta (mg/kg)	Átlag \pm szórás (mg/kg)
0	0,22	0,26	0,27	$0,25 \pm 0,03$
2	0,17	0,20	0,19	$0,19 \pm 0,02$
4	0,14	0,16	0,15	$0,15 \pm 0,01$
8	0,12	0,11	0,10	$0,11 \pm 0,01$
14	0,06	0,07	0,06	$0,06 \pm 0,01$
20	0,05	0,07	0,06	$0,06 \pm 0,01$

15. táblázat Doxiciklin koncentrációja 20-25 cm-es mélységből vett talajmintákban

Hét	1. minta (mg/kg)	2. minta (mg/kg)	3. minta (mg/kg)	Átlag ± szórás (mg/kg)
0	0,19	0,20	0,17	0,19 ± 0,02
2	0,18	0,16	0,19	0,17 ± 0,02
4	0,17	0,15	0,16	0,16 ± 0,01
8	0,14	0,14	0,15	0,14 ± 0,01
14	0,07	0,05	0,07	0,06 ± 0,01
20	0,06	0,07	0,06	0,06 ± 0,01

16. táblázat Doxiciklin koncentrációja 45-50 cm-es mélységből vett talajmintákban

Hét	1. minta (mg/kg)	2. minta (mg/kg)	3. minta (mg/kg)	Átlag ± szórás (mg/kg)
0	0,19	0,14	0,17	0,17 ± 0,02
2	0,13	0,16	0,18	0,16 ± 0,02
4	0,13	0,12	0,13	0,13 ± 0,01
8	0,11	0,06	0,12	0,10 ± 0,03
14	0,05	0,08	0,07	0,07 ± 0,02
20	0,03	0,04	0,03	0,03 ± 0,01

A doxiciklin felezési idejét a korábban részletezettek (5.1.6.9. fejezet és 6.1.1. fejezet) szerint, a $t_{1/2} = -\ln 2/k$ képlet alapján határoztuk meg. Az eliminációs konstans (k) a talaj felszínén történő lebomlás esetében 0,073, a 20-25 cm-es talajmélységben 0,0636, míg az 45-50 cm-es talajmélységben 0,0817 értéknek bizonyult.

Ezek alapján a doxiciklin felezési ideje a különböző talajrétegekben az alábbiak szerint alakult: 66,5 nap (9,5 hét) a felszínen, 76,3 nap (10,9 hét) a 20-25 cm-es és 59,4 nap (8,5 hét) az 45-50 cm-es mélységben.

6.3. Nitrogén transzformációs vizsgálat

A vizsgálatunk során kapott eredményeket összefoglalóan a 17-20. táblázatok szemléltetik. A nitráttartalom hasonló volt a vizsgálat kezdetekor valamennyi doxiciklinnel kezelt talajmintában és a kontrollban is (10 és 15 mg/kg talaj). A 7. napon a hozzáadott szerves tápanyag (lucernaliszt) hatására jelentős nitrátkoncentráció-növekedés volt kimutatható minden egyes talajmintában, ennek mértéke azonban a doxiciklint is tartalmazó talajmintákban lényegesen alacsonyabbnak bizonyult, mint a kontroll mintában. A kontroll talajban mért koncentráció százalékában kifejezve ezek a mennyiségek a következőképpen alakultak: 60,0%, 42,9%, 32,9%, 42,7% és 50,0%. Két hét inkubáció után a kontroll talajmintákban termelődött nitrát mennyiségéhez képest 79,3-88,8% nitrát képződött a többi talajmintában. A 28. napon, a kísérlet utolsó napján 76,9%, 53,0%, 65,6%, 59,7% és 77,1% volt a detektálható nitráttartalom a kezelt mintákban a doxiciklint nem tartalmazó, kezeletlen talajmintához képest.

17. táblázat A vizsgálat kezdetén mért nitrátkoncentrációk különböző mennyiségű hozzáadott doxiciklint tartalmazó talajmintákban

0. nap	A talajban mért nitrátkoncentrációk (mg/kg)			Átlag ± szórás (mg/kg)	Eltérés a kontrollhoz képest (%)
	1. minta	2. minta	3. minta		
Kontroll	13,0	15,5	10,5	13,0 ± 2,5	100,0
25 µg/kg	12,0	9,5	9,0	10,2 ± 1,6	78,5
50 µg/kg	12,5	10,5	10,5	11,2 ± 1,2	86,2
100 µg/kg	12,5	10,0	10,0	10,8 ± 1,4	83,1
200 µg/kg	12,5	10,0	12,5	11,7 ± 1,4	90,0
400 µg/kg	17,0	13,5	15,0	15,2 ± 1,8	116,9

18. táblázat A vizsgálat 7. napján mért nitrátkoncentrációk különböző mennyiségű hozzáadott doxiciklint tartalmazó talajmintákban

	A talajban mért nitrátkoncentrációk (mg/kg)			Átlag ± szórás (mg/kg)	Eltérés a kontrollhoz képest (%)
	1. minta	2. minta	3. minta		
7. nap					
Kontroll	48,0	45,0	42,0	45,0 ± 3,0	100,0
25 µg/kg	38,5	18,5	24,0	27,0 ± 10,3	60,0
50 µg/kg	19,0	26,0	13,0	19,3 ± 6,5	42,9
100 µg/kg	22,5	11,0	11,0	14,8 ± 6,6	32,9
200 µg/kg	20,5	10,5	26,5	19,2 ± 8,1	42,7
400 µg/kg	28,0	21,8	18,0	22,5 ± 5,1	50,0

19. táblázat A vizsgálat 14. napján mért nitrátkoncentrációk különböző mennyiségű hozzáadott doxiciklint tartalmazó talajmintákban

	A talajban mért nitrátkoncentrációk (mg/kg)			Átlag ± szórás (mg/kg)	Eltérés a kontrollhoz képest (%)
	1. minta	2. minta	3. minta		
14. nap					
Kontroll	27,5	37,5	36,5	33,8 ± 5,5	100,0
25 µg/kg	35,5	22,5	22,5	26,8 ± 7,5	79,3
50 µg/kg	27,0	25,0	28,5	26,8 ± 1,8	79,3
100 µg/kg	30,0	28,0	29,5	29,2 ± 1,0	86,4
200 µg/kg	28,0	36,0	26,0	30,0 ± 5,3	88,8
400 µg/kg	29,0	32,5	25,0	28,8 ± 3,8	85,2

20. táblázat A vizsgálat 28. napján mért nitrátkoncentrációk különböző mennyiségű hozzáadott doxiciklint tartalmazó talajmintákban

28. nap	A talajban mért nitrátkoncentrációk (mg/kg)			Átlag ± szórás (mg/kg)	Eltérés a kontrollhoz képest (%)
	1. minta	2. minta	3. minta		
Kontroll	27,5	58,0	57,5	47,7 ± 17,5	100,0
25 µg/kg	52,5	28,5	29,0	36,7 ± 13,7	76,9
50 µg/kg	22,5	25,0	28,5	25,3 ± 3,0	53,0
100 µg/kg	35,0	32,5	26,5	31,3 ± 4,4	65,6
200 µg/kg	24,5	31,0	30,0	28,5 ± 3,5	59,7
400 µg/kg	26,0	35,0	49,5	36,8 ± 11,9	77,1

A nitrogén transzformáció mértéke időbeli és koncentráció szerinti változásának statisztikai vizsgálatát kéttényezős variancia-analízissel végeztük. A statisztikai elemzés részletei a Melléklet 11.1.1. pontjában találhatóak.

6.4. Antibiotikumok talajlakó mikroorganizmusokra kifejtett hatásainak vizsgálata a redoxpotenciál-változás mérésén keresztül

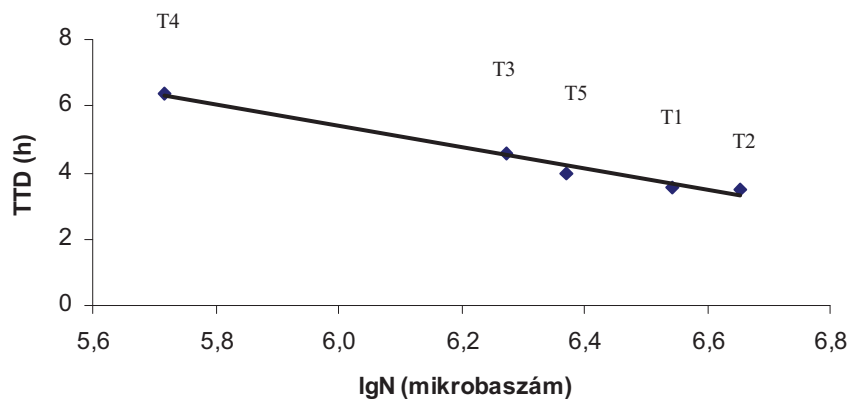
A redoxpotenciál-változásának mérése révén elsődlegesen azt tanulmányoztuk, hogy van-e hatása a doxiciklinnek a talajban lakó egyes mikroorganizmusok anyagcsere-aktivására. Mivel az említett mérési módszert eddig ilyen célra még egyáltalán nem használták, összehasonlításként ugyanakkor azt is vizsgáltuk, hogy tapasztalunk-e más antibiotikumok esetében is kimutatható hatást, valamint a talajok eltérő tulajdonságai befolyásolják-e az antibiotikumok esetleges hatását. Vizsgálatinkban a detektációs kritérium minden mérésnél - 0,8 mV/min volt. Az eredményeket összefoglalóan a 21-33. táblázatok és a 3-9. ábrák szemléltetik. A T5 talaj esetében, mivel az a T2 talajhoz hasonlóan iszapos-agyagos vályog textúrájú, a vulkanikus hamu talaj kifejezést fogjuk használni a továbbiakban.

A kísérletekben mért TTD értékek és a talajmintákból kimutatható mikrobaszámok közötti összefüggést is tanulmányoztuk. Minden talajtípus esetében meghatároztuk a kiindulási mikrobaszámot, amikor az adott talajtípusokhoz nem adtunk antibiotikumot. A kapott eredményeket a 24. táblázat tartalmazza. Amint az a 3. ábrán látható, a talajok mikrobaszáma és a mért TTD értékek között egyértelműen lineáris összefüggés mutatkozik. A lineáris regressziós egyenlet a következő volt: $y=3,2409x+24,854$ ($r=0,991$).

Az egyes talajok, illetve antibiotikumok esetében az illeszkedés szignifikanciájának jellemzésére regresszió analízist végeztünk. Az összefüggés a regresszió analízisből meghatározott korrelációs együtthatók alapján szorosnak tekinthető. A statisztikai elemzés részletei a Melléklet 11.1.2. pontjában találhatóak.

21. táblázat A kezelés megkezdése előtt vett különböző talajmintákból kimutatható mikrobaszám (antibiotikum mentes mintákban)

Talaj típus	Mikrobaszám (cfu/g)	CV%	TTD (h)	SD
Homoktalaj (T1)	$3,5 \cdot 10^6$	25	3,55	0,7515
Iszapos agyagos vályog (T2)	$4,5 \cdot 10^6$	18	3,50	0,1700
Iszapos vályog (T3)	$1,9 \cdot 10^6$	39	4,55	0,6322
Vályog (T4)	$5,2 \cdot 10^6$	22	6,39	0,6718
Vulkanikus hamu talaj (T5)	$2,4 \cdot 10^6$	41	4,00	0,8350



3. ábra A T4, T3, T5, T1 és T2 talajmintákból kimutatható mikrobaszámok és a mért TTD értékek közötti összefüggés

22. táblázat A doxiciklin hatása a TTD-értékre homoktalajban (T1)

Koncentráció ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	TTD-1 (h)	TTD-2 (h)	TTD-3 (h)	Átlagos TTD \pm szórás(h)	TTD-növekedés a kontrollhoz képest (%)
0	3,50	2,83	4,33	$3,55 \pm 0,75$	-
200	10,17	9,33	7,50	$9,00 \pm 1,37$	153,5
400	13,50	10,17	9,67	$11,11 \pm 2,08$	213,0
800	11,17	16,33	15,50	$14,33 \pm 2,77$	303,7
1600	17,67	15,83	17,00	$16,83 \pm 0,93$	374,1

23. táblázat A doxiciklin hatása a TTD-értékre iszapos-agyagos vályog esetében (T2)

Koncentráció ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	TTD-1 (h)	TTD-2 (h)	TTD-3 (h)	Átlagos TTD \pm szórás(h)	TTD-növekedés a kontrollhoz képest (%)
0	3,67	3,50	3,33	3,50 \pm 0,17	-
200	7,17	6,17	8,33	7,22 \pm 1,08	106,3
400	8,67	8,67	7,83	8,39 \pm 0,48	139,7
800	10,50	9,00	10,83	10,11 \pm 0,98	188,9
1600	14,50	11,67	13,50	13,22 \pm 1,44	277,7

24. táblázat A doxiciklin hatása a TTD-értékre iszapos vályog talajban (T3)

Koncentráció ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	TTD-1 (h)	TTD-2 (h)	TTD-3 (h)	Átlagos TTD \pm szórás(h)	TTD-növekedés a kontrollhoz képest (%)
0	4,83	5,00	3,83	4,55 \pm 0,63	-
200	9,00	8,00	10,17	9,06 \pm 1,09	99,1
400	9,67	11,67	11,50	10,95 \pm 1,11	140,7
800	13,5	11,00	11,67	12,06 \pm 1,29	165,1
1600	12,67	16,33	10,33	13,11 \pm 3,02	188,1

25. táblázat A doxiciklin hatása a TTD-értékre vályogtalajban (T4)

Koncentráció ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	TTD-1 (h)	TTD-2 (h)	TTD-3 (h)	Átlagos TTD \pm szórás(h)	TTD-növekedés a kontrollhoz képest (%)
0	5,67	7,00	6,50	6,39 \pm 0,67	-
200	9,17	10,00	12,50	10,56 \pm 1,73	65,3
400	14,33	13,83	13,67	13,94 \pm 0,34	118,2
800	17,50	18,50	16,00	17,33 \pm 1,26	171,2
1600	22,50	23,17	n.a.	22,84 \pm 0,47	257,4

n.a.: nincs adat

26. táblázat A doxiciklin hatása a TTD-értékre vulkanikus hamu talajban (T5)

Koncentráció ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	TTD-1 (h)	TTD-2 (h)	TTD-3 (h)	Átlagos TTD \pm szórás(h)	TTD-növekedés a kontrollhoz képest (%)
0	6,67	6,83	4,00	5,83 \pm 1,59	-
200	8,17	8,17	10,50	8,95 \pm 1,35	53,5
400	8,67	10,33	8,67	9,22 \pm 0,96	58,1
800	9,17	11,33	9,33	9,94 \pm 1,20	70,5
1600	12,17	10,00	10,17	10,78 \pm 1,21	84,9

27. táblázat Doxiciklin hatása a TTD-értékre a különböző talajokban, a kontrollhoz képest mért TTD változások alapján

Koncentráció ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Homoktalaj T1 (%)	Iszapos- agyagos vályog T2 (%)	Iszapos vályog T3 (%)	Vályogtalaj T4 (%)	Vulkanikus hamu talaj T5 (%)
0	-	-	-	-	-
200	153,5	106,3	99,1	65,3	53,5
400	213,0	139,7	140,7	118,2	58,1
800	303,7	188,9	165,1	171,2	70,5
1600	374,1	277,7	188,1	257,4	84,9

A doxiciklin valamennyi vizsgált talajtípusban befolyásolta a redoxpotenciál változását. Ez a hatás a homoktalaj (T1) esetében mutatkozott a legkifejezettebbnek. A TTD érték a koncentráció függvényében, a kontrollhoz képest 153,5-374,1%-os növekedést mutatott ebben az esetben. A legkisebb hatás a vulkanikus hamu talajtípusban (T5) volt kimutatható (53,5-84,9%-os TTD növekedés). Az eredményekből az is látható, hogy doxiciklin esetében már 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ koncentrációnál tapasztalható a detektációs idő növekedése és a koncentráció emelkedésével ez a hatás egyre kifejezettebbé válik.

Az enrofloxacin és a linkomicin esetében az eredményeket összesített formában adjuk meg a következő táblázatokban.

28. táblázat Enrofloxacin hatása a TTD-értékre különböző talajokban

Konc.* (µg/kg)	Homoktalaj (T1)		Iszapos-agyagos vályog (T2)		Iszapos vályog (T3)		Vályogtalaj (T4)		Vulkanikus hamu talaj (T5)	
	Átl.** TTD (h)	TTD-növekedés (%)***	Átl.** TTD (h)	TTD-növekedés (%)***	Átl.** TTD (h)	TTD-növekedés (%)***	Átl.** TTD (h)	TTD-növekedés (%)***	Átl.** TTD (h)	TTD-növekedés (%)***
0	3,50	-	3,83	-	4,28	-	7,17	-	6,84	-
200	5,31	51,7	4,33	13,1	5,00	16,8	7,11	-	10,56	54,4
400	6,08	73,7	4,39	14,6	4,78	11,7	9,94	38,6	11,06	61,7
800	6,72	92,0	4,67	21,9	3,83	-	10,06	40,3	12,78	86,8
1600	7,50	114,3	4,89	27,7	5,05	18,0	9,72	35,6	15,17	121,8

* Koncentráció

** Átlagos

*** a kontrollhoz képest

Az enrofloxacin hatása a redoxpotenciál-változásra kevésbé kifejezett volt, sőt az iszapos vályogtalaj (T3) és a vályogtalaj (T4) esetében egyáltalán nem is volt kimutatható koncentrációfüggő hatás és az az iszapos-agyagos vályog (T2) esetében is meglehetősen korlátozottnak bizonyult. A homoktalajban (T1) és a vulkanikus hamu talajban (T5) a hatás erőssége közel azonos (51,7-114,3%-os, illetve 54,4-121,8%-os TTD növekedés). Ez utóbbi két talajtípus esetében már 200 µg/kg koncentrációnál jelentősen változott a detektációs idő.

29. táblázat Linkomicin hatása a TTD-értékre különböző talajokban

Konc.* (µg/kg)	Homoktalaj (T1)		Iszapos-agyagos vályog (T2)		Iszapos vályog (T3)		Vályogtalaj (T4)		Vulkanikus hamu talaj (T5)	
	Átl.** TTD (h)	TTD-növekedés (%)***	Átl.** TTD (h)	TTD-növekedés (%)***	Átl.** TTD (h)	TTD-növekedés (%)***	Átl.** TTD (h)	TTD-növekedés (%)***	Átl.** TTD (h)	TTD-növekedés (%)***
0	3,75	-	4,78	-	3,78	-	7,84	-	4,25	-
200	6,00	60,0	5,39	12,8	5,28	39,7	9,89	26,1	8,50	100,0
400	7,17	91,2	6,50	36,0	5,42	43,4	10,22	30,4	9,33	119,5
800	7,50	100,0	6,67	39,5	5,95	57,4	11,56	47,4	10,08	137,2
1600	8,09	115,7	7,56	58,2	7,00	85,2	12,50	59,4	11,72	175,8

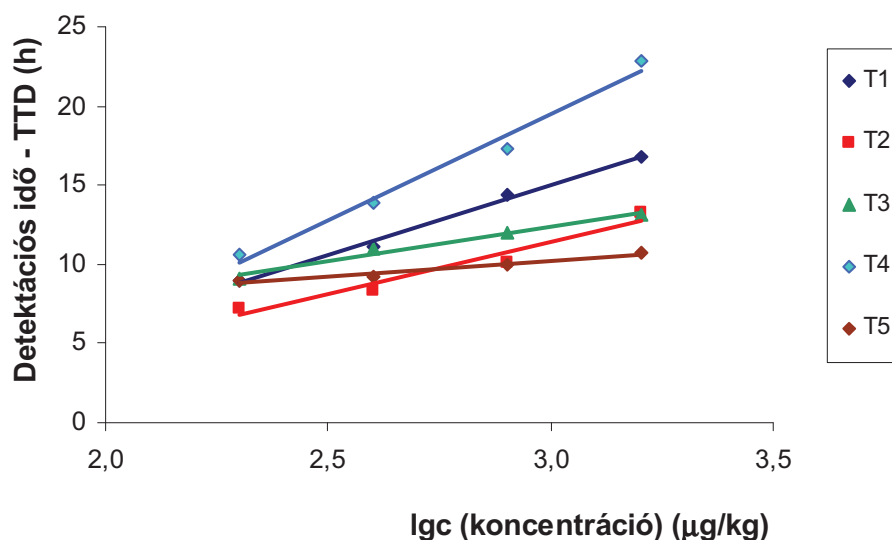
* Koncentráció

** Átlagos

*** a kontrollhoz képest

Linkomicin esetében is tapasztalható, hogy az antibiotikum hatása a redoxpotenciál-változás mértékére a koncentráció függvényében talajtípusonként változó. A legkifejezettebb hatás a homoktalaj (T1), az iszapos vályogtalaj (T3) és a vulkanikus hamu talaj (T5) esetében tapasztalható (60,0-115,7%-os, 39,7-85,2%-os és 100,0-175,8%-os TTD-növekedés), míg a többi talajban a TTD-változás csekélyebb. Az említett talajokban a linkomicin hatása már 200 µg/kg koncentrációnál látható.

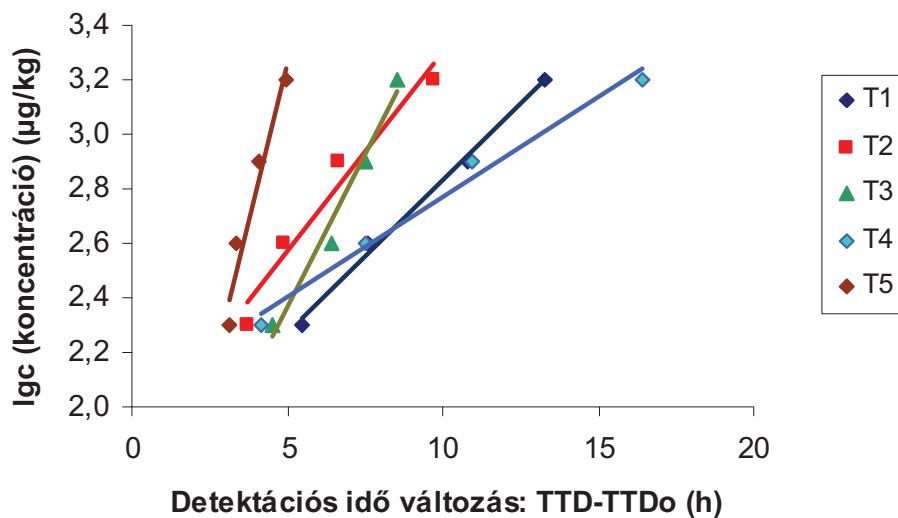
A koncentrációk logaritmusának (lgc) és a TTD-változás kapcsolatát lineáris regresszióval vizsgáltuk. Az összefüggéseket a 4. ábra szemlélteti az egyes antibiotikumok, illetve talajok vonatkozásában.



4. ábra A detektációs idő (TTD) változása a doxyciklin koncentráció változásának függvényében a vizsgált talajmintákban (T1-T5)

A lineáris regressziós egyenlet a homoktalaj (T1) esetében $y=8,8762x-11,612$ ($r=0,997$), iszapos-agyagos vályog talaj (T2) esetében $y=6,5508x-8,295$ ($r=0,976$), iszapos vályog talaj (T3) esetében $y=4,4082x-0,8414$ ($r=0,989$), vályog talaj (T4) esetében $y=13,362x-20,614$ ($r=0,992$) és vulkanikus hamu talaj (T5) esetében $y=2,0662x+4,0359$ ($r=0,979$) volt.

Az egyes koncentrációkhoz tartozó TTD növekedést a koncentrációk logaritmusának függvényében ábrázoltuk. Az egyenes tengelymetszete meghatározza a minimális gátló koncentráció logaritmusát (lgCo). Az összefüggéseket az 5 ábra szemlélteti



5. ábra A doxiciklin koncentrációjának változása a detektációs idő változásának függvényében a vizsgált talajmintákban (T1-T5)

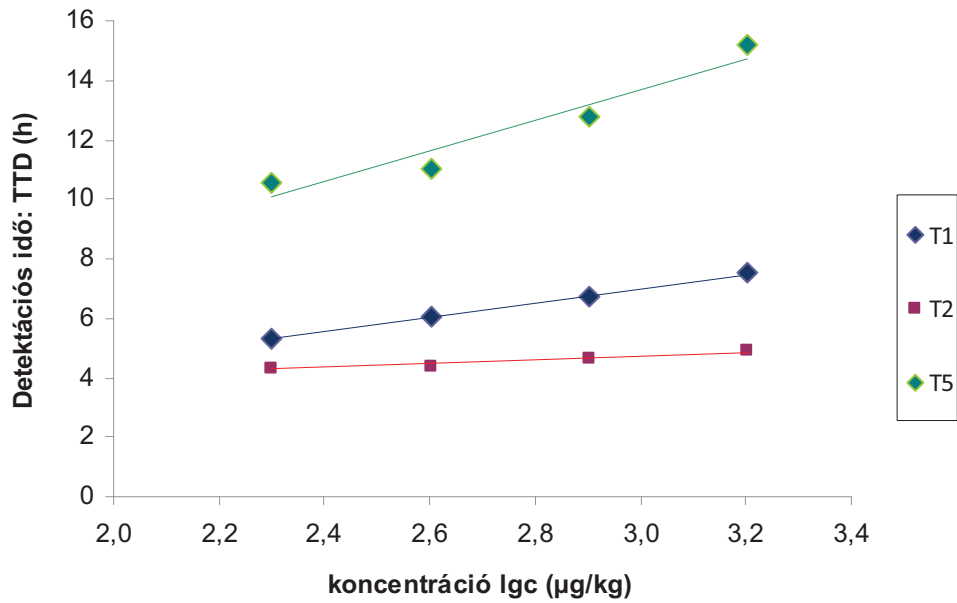
A 4. ábra, illetve az azon feltüntetett egyenletek és a korrelációs együtthatók jelzik a lineáris összefüggést az alkalmazott doxiciklin koncentrációk és a mért detektációs idők között az öt vizsgált talajtípusban. A 5. ábrán látható egyenesek egyenletei a következők: homoktalaj (T1) talaj esetében $y=0,112x+1,7145$, iszapos-agyagos vályog talaj (T2) esetében $y=0,1453x+1,2579$, iszapos vályog talaj (T3) esetében $y=0,2218x+1,2579$, vályog talaj (T4) esetében $y=0,0736x+2,0328$ és vulkanikus hamu talaj (T5) esetében $y=0,4639x+0,948$. A 5. ábra alapján meghatározható a különböző talajtípusok esetében az ún. gátló hatás küszöbértéke, azaz a legkisebb hatékony koncentráció, mely doxiciklin esetében a 30. táblázatban bemutatottak szerint alakult:

30. táblázat A doxicklin gátló hatásának küszöbértékei a különböző talajtípusokban

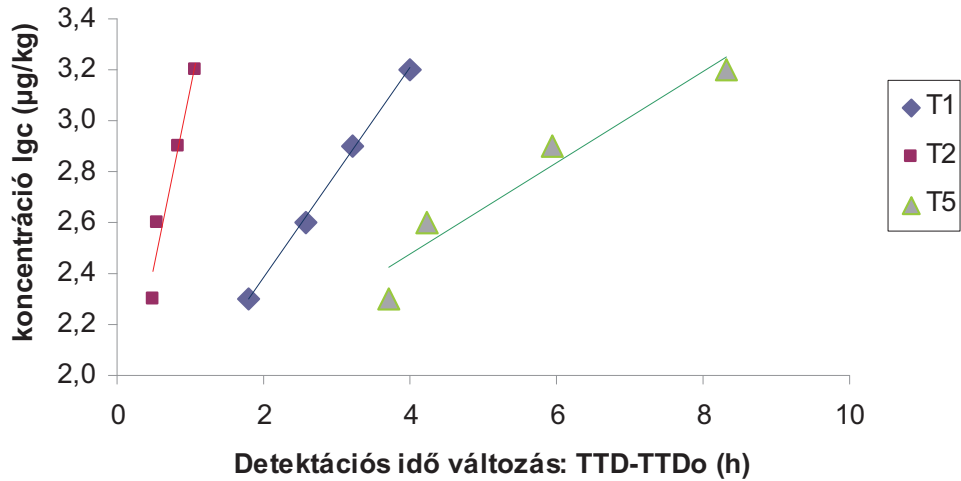
Talajtípus	c_0 ($\mu\text{g}/\text{kg}$ - a gátló hatás küszöbértéke)
Homoktalaj (T1)	52,0
Iszapos-agyagos vályog (T2)	70,0
Iszapos vályog (T3)	18,0
Vályogtalaj (T4)	108,0
Vulkanikus hamu talaj (T5)	9,0

A fenti küszöbértékek valamennyi talajtípus esetében alacsonyabbak, mint a doxiciklint tartalmazó trágya kijuttatása után 8 héttel a talaj felszínén, illetve 20-25 cm-es mélységben mért antibiotikum koncentrációja (110-140 $\mu\text{g}/\text{kg}$). A homok-, hordalék- és vulkanikus talajok esetében pedig még a 20. héten is alacsonyabbak a gátló hatás küszöbértékei, mint a mért doxiciklin koncentráció (60 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

A 6. ábrán az alkalmazott enrofloxacin koncentráció logaritmus (lgc) és a detektációs idő közötti összefüggés linearitása látható. A lineáris regressziós egyenlet a homoktalaj (T1) talaj esetében $y=2,3962x-0,1924$ ($r=0,9993$), iszapos-agyagos vályog talaj (T2) esetében $y=0,6467x+2,79$ ($r=0,9729$) és vulkanikus hamu talaj (T5) esetében $y=5,1667x-1,8317$ ($r=0,9645$) volt. A 7. ábrán ábrázolt egyenesek egyenletei a következők: homoktalaj (T1) talaj esetében $y=0,4168x+1,5425$, iszapos-agyagos vályog talaj (T2) esetében $y=1,4639x+1,6693$ és vulkanikus hamu talaj (T5) esetében $y=0,1801x+1,7523$. A 7. ábra segítségével enrofloxacin esetében is meghatározható az ún. gátló hatás küszöbértéke, mely az antibiotikum esetében a vizsgált talajtípusokban a 31. táblázatban bemutatottak szerint alakult. A 6-7. ábrákon csak a homoktalajban (T1), az iszapos-agyagos vályog talajban (T2) és a vulkanikus hamu (T5) talajtípus esetén mért eredményeket tüntettük fel, mivel ezek esetében lehetett csak szignifikáns hatást tapasztalni az enrofloxacin esetében. Ezen talajtípusoknál az eredmények közötti összefüggések lineárisak voltak.



6. ábra A detektációs idő (TTD) változása az enrofloxacin koncentráció változásának függvényében a vizsgált talajmintákban (T1, T2 és T5)

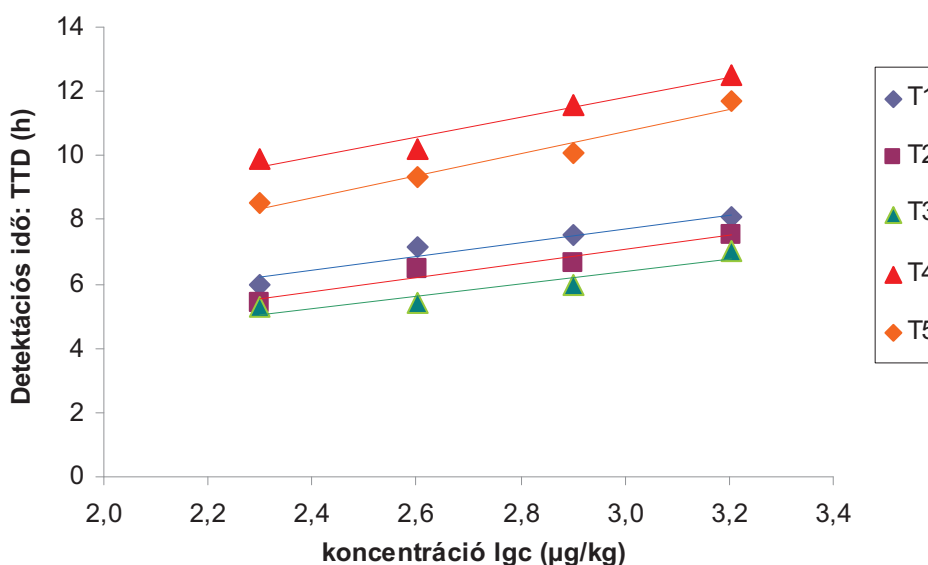


7. ábra A gátló hatás küszöbértékének meghatározása enrofloxacin tartalmú talajmintákban (T1, T2 és T5)

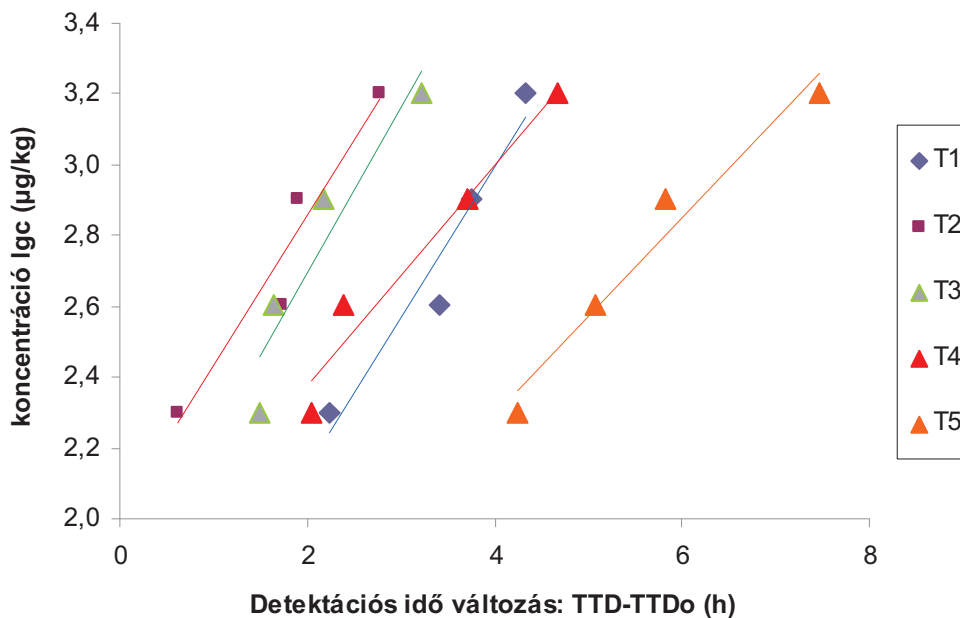
31. táblázat Az enrofloxacin gátló hatásának küszöbértékei a különböző talajtípusokban

Talajtípus	c_o ($\mu\text{g}/\text{kg}$ - a gátló hatás küszöbértéke)
Homoktalaj (T1)	35,0
Iszapos-agyagos vályog (T2)	47,0
Vulkanikus hamu talaj (T5)	57,0

A 8. ábrán az alkalmazott linkomicin koncentráció (lgc) és a detektációs idő közötti összefüggés linearitása látható. A lineáris regressziós egyenlet a homoktalaj (T1) talaj esetében $y=2,1892x+1,1617$ ($r=0,9687$), iszapos-agyagos vályog talaj (T2) esetében $y=2,2146x+0,4324$ ($r=0,9676$), iszapos vályog talaj (T3) esetében $y=1,8941x+0,6961$ ($r=0,941$), vályog talaj (T4) esetében $y=3,0451x+2,6598$ ($r=0,9779$) és vulkanikus hamu talaj (T5) esetében $y=3,4581x+0,3887$ ($r=0,9819$) volt. A 9. ábrán ábrázolt egyenesek egyenletei a következők: homoktalaj (T1) talaj esetében $y=0,4287x+1,279$, iszapos-agyagos vályog talaj (T2) esetében $y=0,4228x+2,0119$, iszapos vályog talaj (T3) esetében $y=0,4675x+1,7569$, vályog talaj (T4) esetében $y=0,314x+1,7461$ és vulkanikus hamu talaj (T5) esetében $y=0,2783x+1,1779$. A 9. ábra segítségével linkomicin esetében is meghatározható az ún. gátló hatás küszöbértéke, mely az antibiotikum esetében a vizsgált talajtípusokban a 32. táblázatban bemutatottak szerint alakult:



8. ábra A TTD-értékek változása a koncentráció változás függvényében linkomicin tartalmú talajmintákban (T1-T5)



9. ábra A gátló hatás küszöbértékének meghatározása linkomicin tartalmú talajmintákban (T1-T5)

32. táblázat A linkomicin gátló hatásának küszöbértékei a különböző talajtípusokban

Talajtípus	c_o (µg/kg - a gátló hatás küszöbértéke)
Homoktalaj (T1)	19,0
Iszapos-agyagos vályog (T2)	41,0
Iszapos vályog (T3)	57,0
Vályogtalaj (T4)	56,0
Vulkanikus hamu talaj (T5)	15,0

Mint az adatok jelzik, a gátló hatás küszöbértékei a linkomicin esetében a doxiciklinéhoz hasonló nagyságrendben találhatók a különböző talajtípusokban. Az enrofloxacin gátló hatásának küszöbértékei a homok-, az agyagos és a vulkanikus talajokban a másik két

antibiotikumhoz hasonlóan tekinthetők, a hordalék- és vályogtalajok esetében viszont nem tapasztaltunk kimutatható hatást.

Korábbi vizsgálatunkban meghatároztuk hagyományos módszerrel a doxiciklinnek a mikrobaszám alakulására gyakorolt hatását a homoktalajban (T1). A 30 °C-on szabványos lemezöntéses módszerrel meghatározható mikrobaszámok azt mutatták, hogy egyik koncentráció esetében sem változott szignifikánsan a kimutatható mikroorganizmusok nagyságrendje, azaz a mikrobaszámban nem következett be változás (33. táblázat). A mikrobák számát a fejezet elején leírt módon végeztük. A mikroba populációk minőségi változásáról, így a talajban esetlegesen megváltozott faji összetételről, illetve diverzitásról a használt módszer ugyanakkor nem ad információt.

33. táblázat Mikrobaszám különböző doxiciklin koncentrációk esetén a homoktalaj mintákban (T1)

Koncentráció ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Mikrobaszám átlag 30 °C-on (cfu/g)	CV%
0	$8,1 \cdot 10^6$	11
200	$6,0 \cdot 10^6$	28
400	$8,2 \cdot 10^6$	19
800	$6,7 \cdot 10^6$	40
1600	$7,1 \cdot 10^6$	21

7. Megbeszélés - Következtetések

Vizsgálatainkban a hagyományos tetraciklinektől részben eltérő fizikai-kémiai és hatástani tulajdonságokkal rendelkező doxiciklin környezetben való viselkedését, valamint a talaj egyes mikroorganizmusainak anyagcsere-aktivására gyakorolt egyes hatásait tanulmányoztuk. Vizsgáltuk a hatóanyag lebomlását sertéstrágyában (laboratóriumi és üzemi körülmények között), majd ezt követően meghatároztuk a doxiciklin lebomlásának mértékét és ütemét az antibiotikumot tartalmazó trágyával kezelt talajban. Az irodalmi adatok alapján a doxiciklin a környezet élővilágát tekintve leginkább növényekre és a talaj mikroorganizmusaira lehet direkt hatással. Vizsgálatunkban mi ez utóbbi hatást vizsgáltuk, ezért kísérletünkben az úgynevezett nitrogén transzformációs vizsgálattal, valamint egy eddig erre a célra nem használt új módszerrel, a redoxpotenciál-változás mérésével tanulmányoztuk az esetleges hatást a talajban élő mikroorganizmusokra.

7.1. Doxiciklin lebomlása sertéstrágyában

A doxiciklin lebomlását sertéstrágyában különböző körülmények között vizsgáltuk. Az *in vitro* vizsgálatban a trágyát az EMEA/CVMP/ERA/418282/2005-Rev. 1. (CVMP, 2008) és az EMA/CVMP/ERA/430327/2009 (EMA, 2011) szakmai irányelvekben leírt körülmények között éreltük. Míg a másik trágyaérleléses vizsgálatban a doxiciklin tartalmú trágyát, hagyományosan, a telepi gyakorlatnak megfelelően a szabad ég alatt tartottuk, kitéve az időjárás hatásának.

Laboratóriumi körülmények között a doxiciklin kiindulási koncentrációjának 33,1%-át tudtuk kimutatni a 16 hetes érlelési időszak végén, míg a telepen az eredeti doxiciklin mennyiség 10,7%-a volt kimutatható a 12 hetes trágyaérlelési periódus végére, azaz az anyavegyület 66,9, illetve 89,3%-a lebomlott a 16, illetve 12 hetes érlelés során. A sertéstrágyában történő lebomlás vizsgálatát a vonatkozó EMA irányelv szerint legalább 91 napon át tartó érleléssel kell vizsgálni. Ennek megfelelő időtartamú vizsgálatról szóló irodalmi adat nem található a szakirodalomban. Fernández et al. (2004) a doxiciklin egyes biológiai hatásainak vizsgálatához készített doxiciklin hozzáadásával (75 és 7500 mg/l koncentrációban) doxiciklinnel kevert, kezeletlen trágyamintákat és ezeket aerob, illetve anaerob körülmények között 15 napig érlelték. A vizsgált 15 napos periódus végén a hozzáadott antibiotikum 60,4%-a (45,3 mg/l), illetve 50,3%-a (3772 mg/l) volt kimutatható. Az általunk végzett vizsgálatban, amelyben laboratóriumi körülmények között, BOD edényekben, állandó

hőmérsékleten ($20 \pm 3,5$ °C) érleltük a trágyát klímakamrában, még 42 nap (6 hét) érlelés után is ki tudtuk mutatni a kiindulási doxiciklin koncentráció 53,3%-át. Így az időarányos lebomlás a saját vizsgálataink szerint lassabbnak bizonyult.

A gazdaságban, gyakorlati körülmények között végzett vizsgálatban a kezdeti doxiciklin koncentráció (87,4 mg/kg trágya) magasabb volt, mint az *in vitro* kísérletben. A 12 hetes trágyaérlelési időszakban a doxiciklin lebomlása gyorsabbnak bizonyult a szabadföldi körülmények között, mint a laboratóriumban. A lehetséges különbség egyrészt magyarázható a trágyahalomban a természetes fénynek kitett doxiciklin fotodegradációjával, amint annak lehetőségét egyéb antibiotikumok esetében más szerzők is leírták (Boxall et al., 2003a; Alexy et al., 2004). Másrészt viszont az antibiotikum lebomlásában jelentkező különbségre magyarázatot jelenthet egyéb környezeti faktorok hatása, így pl. az eső, amely a doxiciklin talajba való bemosódását okozhatta. Vizsgálva az érlelés körülményinek hatását a tetraciklinek lebomlására, más szerzők is különbséget tapasztaltak az antibiotikumok lebomlásában a különböző körülmények között érlelt trágyában. Szellőztetett sertéstrágyában a tetraciklin kb. 50%-a bomlott le négy és fél nap alatt, míg nem szellőztetett trágya esetén hasonló bomlás eléréséhez kétszer annyi komposztálási időre volt szükség (Sarmah et al., 2006). Harminc napos, 30 °C-on végzett trágyaérlelési időszak alatt kb. 56%-a, 20 °C-on csupán 12%-a bomlott le a trágyában eredetileg jelen lévő klórtetraciklinnek, míg 4 °C-on 30 nap alatt bomlás nem volt kimutatható, jelezve a hőmérséklet kiemelkedő szerepét az antibiotikumok lebomlásában (Sarmah et al., 2006).

Az általunk végzett laboratóriumi és telepi vizsgálatban a doxiciklin felezési ideje a trágyában 52,5 nap (7,5 hét), illetve 25,7 nap (3,68 hét)értéknek bizonyult, jelezve hogy közel kétszer olyan gyors lebomlás jellemzi a doxiciklint a gazdaságban bevett gyakorlat szerint, a természetes körülmények között végrehajtott trágyaérleléses vizsgálat során, mint az OECD által ajánlott, kontrollált laboratóriumi körülmények között történt érlelés folyamán. Bao et al. (2009) klórtetraciklin esetében brojler csirke bélsarában 11,0, tojótyúk trágyájában 12,2 és sertéstrágyában 86,6 napos felezési időt állapítottak meg aerob érlelés során, laboratóriumi körülmények között. Arikán (2007) *in vitro* kísérletben anaerob körülmények között érlelt klórtetraciklin tartalmú szarvasmarha hígtrágyát 33 napig, 35 °C-on. Az általa meghatározott felezési idő 18 nap volt, jelezve hogy a magasabb hőmérséklet az antibiotikumok bomlását meggyorsítja. Az oxitetraciklin felezési ideje üledékes iszapban 42-46 nap, talajban és hígtrágyában 18-79 nap és sertéstrágyában 30 nap volt (Ingerslev és Halling-Sørensen, 2001; De Liguoro et al., 2003; Kay et al., 2005). Jóllehet a hivatkozott eredmények tetraciklinre, klórtetraciklinre és oxitetraciklinre vonatkoznak, alapvetően hasonló tartományba esnek, mint a saját kísérleteink esetében a doxiciklinnel kapott eredmények.

A laboratóriumi körülmények között végrehajtott trágyaérleléses vizsgálatban a lebomlás lassabban következett be, mint a telepen végrehajtott kísérletben. Annak ellenére, hogy a hőmérséklet magasabb (kb. 20°C) volt az *in vitro* kísérletben a felezési idő 52,5 nap volt, míg a telepen végzet vizsgálat során 25,7 napos felezési időt kaptunk, holott a hőmérséklet a 15°C-ot nem haladta meg, igaz alig süllyedt fagypontra alá. Ez alapján azt feltételezhetjük, hogy a doxiciklin sertéstrágyában történő lebomlása során nem a hőmérséklet a leginkább meghatározó tényező. Ebből a szempontból fontosabb szerepe lehetett az antibiotikum lebomlásában az aerob viszonyoknak, a szél szárító hatásának, valamint az esőnek, amely a doxiciklin trágyából való kimosódásához vezetett.

Vizsgálataink eredményei azt jelzik, hogy a terápiás dózisban és javasolt ideig doxiciklinnel kezelt sertésből származó, anaerob körülmények között 3 hónapig érlelt trágya még 9-13 mg/kg koncentrációban tartalmazta az antibiotikumot.

7.2. Doxiciklin lebomlása mezőgazdasági talajban

A kísérletben doxiciklin tartalmú trágyával kezeltünk mezőgazdasági földterületet és azt vizsgáltuk, hogy a talaj különböző mélységeiben milyen mértékű az antibiotikum lebomlása.

A trágyázott talaj felszínén a kijuttatott doxiciklin mennyiségének (0,25 mg/kg) 76%-a bomlott le a mintavételi időszak végére (20 hét), a talaj 20-25 cm-es mélységében ez az érték 67 %, míg 45-50 cm-es mélységben 81% volt. Bár a doxiciklin talaj felszínén való lebomlására, illetve talajban mérhető koncentrációjára vonatkozó adatok nem találhatók az irodalomban, más tetraciklineket viszont kimutattak különböző talajokban 0,004-0,09 mg/kg közötti értékben (Kümmerer, 2004; Hamscher et al., 2005; Sarmah et al., 2006). Az adatok azonban az eltérő körülmények miatt nem, vagy többnyire alig összevethetőek az általunk kapott eredményekkel.

A talaj mélyebb rétegeiben kimutatható tetraciklinek mennyiségéről és lebomlásáról is csak korlátozottan állnak rendelkezésre irodalmi adatok. A tetraciklin és klórtetraciklin koncentrációját Hamscher et al. (2005) közel hasonló talajmélységben vizsgálták hígtrágyával kezelt földben, és azt találták, hogy 30-40 cm-es, illetve 20-30 cm-es mélységben 0,117 mg/kg, illetve 0,039 mg/kg mennyiségben volt a két tetraciklin kimutatható. Ugyanakkor De Liguoro et al. (2003) 60 cm-es mélységből már nem tudtak tetraciklint detektálni. A saját vizsgálataink esetében annak oka, hogy a mélyebb rétegekben is ki lehetett mutatni a doxiciklint (0,19 mg/kg és 0,17 mg/kg koncentrációban) az lehet, hogy a beszántással a felszínről a mélyebb talajrétegbe jutott az antibiotikum. A tetraciklinek kémiai tulajdonságainak ismeretében nem valószínű, hogy jelentősebb mennyiségben bemosódott volna mélyen a talajba, mivel a tetraciklinek mobilitása talajokban viszonylag csekély mértékű (De Liguoro et al., 2003; Kümmerer, 2004, Hamscher et al., 2005; Kumar et al., 2005; Sarmah et al., 2006).

A doxiciklin felezési ideje a különböző talajmélységekben a következőképpen alakult: a talaj felszínén 66,5 nap (9,5 hét), 20-25 cm-es mélységben 76,3 nap (10,9 hét) és 45-50 cm-es mélységben 59,4 nap (8,5 hét). Ezek az értékek magasabbak, mint arról más tetraciklinek esetében Boxall et al. (2005), Kumar et al. (2005) és Blackwell et al. (2007) beszámoltak. A különbség okaként szerepelhet a doxiciklin és a hagyományos tetraciklinek fizikai-kémiai tulajdonságai közötti eltérés, de magyarázható lehet a különböző környezeti tényezőkkel, illetve a különböző talajokra jellemző tulajdonságokkal is. A degradáció mértéke, a tetraciklinek talajban való kinetikája, sorsa és perzisztálása nagymértékben függ a hőmérséklettől, a pH-tól, a természetes fénynek való kitettségtől, a talaj összetételétől, a talaj szervesanyag tartalmától, stb. Gavalchin - Katz (1994) vizsgálataiban több más antibiotikum

mellett, a klórtetraciklin lebomlását tanulmányozták különböző körülmények között. Az eredmények szerint 44%, 88% és majdnem 100%-a az eredeti klórtetraciklinnek még 30 nap után is kimutatható volt talajban 30 °C-on, 20 °C-on illetve 4 °C-on. Sarmah et al. (2006) arról számoltak be, hogy a talajtípusnak nagy jelentősége van az antibiotikumok lebomlásában, ahogyan azt a mi vizsgálatunkban is sikerült igazolni.

Saját vizsgálatunkban 20 hét után is kimutatható volt a doxiciklin a talajban, akár a mélyebb talajrétegekben is. Hamscher et al. (2005), 3 éven keresztül vizsgáltak trágyázott területről származó talajmintákat több más antibiotikum mellett tetraciklin jelenlétére és azt találták, hogy az antibiotikum átlagos koncentrációja a vizsgálat utolsó két évében 0,15 mg/kg felett volt a mintákban. Az említett adatok egyszeri trágyázás után 7 hónappal mért koncentrációkat jelentenek.

Vizsgálataink eredményei arra utalnak, hogy az érlelt trágyával a szántóföldre kijuttatott doxiciklin még 20 héttel a trágyázást követően is kimutatható a talaj különböző mélységeiből. A 8 héttel a trágya kijuttatását követően mért értékek a felszíni és a 20-25 cm-es mélységből vett mintákban (0,11 mg/kg, illetve 0,14 mg/kg) még meghaladták a vonatkozó EMEA irányelvekben meghatározott 100 µg/kg-os (0,1 mg/kg) határértéket. A trágyázást követő 14. és 20. héten detektált mennyiségek (0,06 mg/kg) viszont már nem érték el az előbbi küszöbértéket.

7.3. Nitrogén transzformációs vizsgálat

A doxiciklin potenciális hatását a talajban élő mikroorganizmusokra a nitrogén transzformációs teszt segítségével vizsgáltuk. A kísérletet az OECD 216 sz. irányelve szerint végeztük. Az ezekben leírtakat követve lucernalisztet, mint táplálékforrást adagoltunk valamennyi vizsgált mintához, így a kontrol talajhoz is, ezért ez nem befolyásolta az eredményeket. Az egyetlen különbség a kontrol és kezelt talajok között a doxiciklin koncentrációjában volt, így a kísérletben a különböző doxiciklin koncentrációk gátló hatását tudtuk meghatározni a kontrol (antibiotikumot nem tartalmazó) talajjal összehasonlítva.

Az eredmények azt mutatják, hogy az inkubáció hetedik napján a mérhető nitráttartalom jelentősen emelkedett. Ennek hátterében a lucernaliszt mint szerves tápanyagforrás hozzáadása állhat, amelyet a talajmintában élő mikroorganizmusok hasznosítottak. Az egy hetes inkubáció után mérhető nitrátkoncentrációk különbsége a kezelt, illetve a kontroll mintákban szintén jelentős volt. A kezeletlen talajban mérhető értékekhez képest 32,9-60%-kal kevesebb nitrát képződött, aminek hátterében a doxiciklin talajmikrobákra kifejtett gátló hatása állhat. A 14 és 28 napos inkubáció után a koncentráció különbség kezdett kiegyenlítődni, bár a kezelt talajokban mérhető koncentráció végig a kontrollban mérhető értékek alatt maradt. Ugyanakkor a doxiciklint különböző koncentrációban tartalmazó talajmintákból meghatározható nitrátkoncentrációkban nem mutatkozott szignifikáns különbség. A vizsgálat végén tapasztalható kiegyenlítődéssel magyarázható lehet azzal, hogy idővel a talaj mikrobiális populációja alkalmazkodott a doxiciklin jelenlétéhez. Ez jelentkezhethet, pl. a mikrobiális szerkezet vagy diverzitás változásában. Thiele-Bruhn és Beck (2005) oxitetraciklin és szulfonamidok talajmikrobákra kifejtett hatását vizsgálták, és azt tapasztalták, hogy az említett antibiotikumok egy állandó szelekciós nyomást jelentettek a mikrobákra és ez egy elmozdulást eredményezett a baktériumok és gombák arányában ez utóbbiak javára. Más szerzők arra is rámutattak, hogy a tilozin hatására megváltozott mikrobiális sokszínűség visszatér az eredeti állapotba, viszont a közösségi szerkezetben bekövetkező változások tartósan bizonyultak (Westergaard et al., 2001). Kong et al. (2006) hívják fel a figyelmet arra, hogy fontos mikrobiológiai funkciók, mint a maradékanyagok lebomlása csökkenhet a talajban, amennyiben azt antibiotikumot tartalmazó trágyával kezelik. Vizsgálatunkban azt tapasztaltuk, hogy a doxiciklin gátolja a mikrobiális nitrogén transzformációt a talajban, bár ez a hatás átmeneti. Ugyanakkor, az említett publikációk alapján azt is feltételezhetjük, hogy a doxiciklin befolyásolhatja a talaj mikrofóráját, illetve annak bizonyos funkcióit olyan talajokban, amelyeket antibiotikum tartalmú trágyával kezeltek, még akkor is, ha az antibiotikum csak alacsony koncentrációban van jelen.

Összességében vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a doxiciklin átmenetileg gátolta a talajban a mikrobiális nitrogén transzformációt, de a vizsgált 25-400 µg/kg koncentrációban a gátlás mértéke nem érte el a vonatkozó EMEA irányelvben meghatározott, a kontrollhoz viszonyított legalább 25%-os értéket. Ennek alapján a hatás biológiailag nem tekinthető jelentősnek.

7.4. Antibiotikumok talajlakó mikroorganizmusokra kifejtett hatásainak vizsgálata a redoxpotenciál-változás mérésén keresztül

A korábban részletesen leírt redoxpotenciál-változást detektáló módszert már korábban eredményesen használták mikrobaszám meghatározásra (Reichart et al., 2007b). Mivel a mikroorganizmusok a szaporodásuk, anyagcseréjük során megváltoztatják a környezetük redoxpotenciálját, kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy a talajmintákhoz adott antibiotikumok hatására mutatkozik-e bármilyen változás ebben a folyamatban. Továbbá választ kerestünk arra is, hogy az antibiotikum és, a talaj típusa, illetve a talaj fizikai, kémiai tulajdonságai befolyásolják-e és ha igen, milyen mértékben a talajlakó mikroorganizmusokra kifejtett hatást. Az előbbieket mellet meghatároztuk a gátló hatás küszöbértékeit is a különböző talajtípusokban. Vizsgálatainkban, a doxiciklin mellett másik két antimikrobiális szer, az enrofloxacin és a linkomicin hatásait is tanulmányoztuk.

A mikroorganizmusok szaporodása és anyagcseréje folyamán az energiatermelő biológiai oxidációs reakciók eredményeként a környezet redoxpotenciálja jól mérhetően csökken. A detektációs idő (TTD) a redoxpotenciál-változás sebességétől függ. Minél inkább gátolt az adott közegben a mikroorganizmusok anyagcseréje, illetve szaporodása, annál nagyobb TTD értéket kapunk. Tekintettel arra, hogy a redoxpotenciál mérésén alapuló módszer a mikroorganizmusok anyagcseréjére visszavezethető változásokat méri, a mért TTD érték a mikrobiológiai aktivitásra jellemző. A mikrobiológiai aktivitás (A) a mikrobaszám (N) és a fajlagos anyagcsere-mérték (ráta, intenzitás) (P) szorzataként értelmezhető: $A = N \cdot P$. Az aktivitás változása eredhet a sejtszám-változásából és a fajlagos anyagcsere mérték változásából is. Amennyiben a környezeti tényezők változatlanok, a fajlagos anyagcsere mértéke (intenzitása) állandó, a TTD értéke csak a mikrobaszámtól függ. Ezen alapulnak a mikrobiológiai kalibrációs görbék. Ha a mikrobaszám állandó, a TTD értékek változása a környezeti tényezők fajlagos anyagcsere mértékére kifejtett hatását tükrözi. Ez lehetővé teszi, pl. a gátlóanyag koncentráció mérésére szolgáló kalibrációs görbék felvételét, vagy gátlóanyag inaktiválódás sebességének TTD méréssel történő meghatározását. Talajok esetében igazoltuk, hogy a kimutatható mikrobaszám antibiotikumot tartalmazó, illetve antibiotikum mentes táptalajok esetében sem változik. Természetesen a kapott eredmény a talaj azon mikroorganizmusaira vonatkozik, amelyek az általunk biztosított körülmények között kitenyészthetők, ahogyan az minden egyéb vizsgált mátrix (pl. élelmiszer, környezeti minta, stb.) esetében is igaz. Mivel a talaj összetétele és a szuszpenzióhoz adott táptalaj összetétele is állandó, ezért a TTD változását a fajlagos anyagcsere-mérték változása okozza, amelyet az adott körülmények között csak az antibiotikum eredményezhet.

Mindhárom antibiotikum esetében tapasztaltunk gátló hatást. Ez a doxiciklin esetében volt legkifejezettebb, mivel a detektációs időt ez az antibiotikum növelte meg legnagyobb mértékben. Az enrofloxacinnak és a linkomicinnek elsősorban a homoktalajban (T1) és a vulkanikus hamu talajban (T5) volt kimutatható hatása. Az antibiotikumok gátlása már 200 µg/kg-os koncentrációban jelentkezett, de 400 µg/kg-os koncentrációtól volt igazán jelentős.

A talaj típusa is egyértelműen befolyásolta az antibiotikumoknak a talaj mikroflórájára kifejtett hatását. Az enrofloxacin az iszapos-agyagos vályog (T2) és az iszapos vályog (T3) esetében gyakorlatilag nem mutatott gátló hatást. A gátló hatás küszöbértéke, azaz a hatást kiváltó legkisebb koncentráció mindhárom antibiotikum esetében talajtípusonként eltérő volt. Doxiciklin esetében a küszöbérték vulkanikus és hordalék talajokban < 20 µg/kg értéknek bizonyult, vályogtalajban meghaladta a 20 µg/kg-ot. Az enrofloxacin esetében a küszöbértékek 30-60 µg/kg között változtak homok-, agyagos- és vulkanikus talajokban, míg hordalékos és vályogtalajok esetében kimutatható hatás nem mutatkozott. A linkomicin gátló hatásának küszöbértékei 15-60 µg/kg nagyságrendben változtak. A vizsgálatok eredményei összefoglalóan arra utalnak, hogy a doxiciklin és a linkomicin, valamint egyes talajtípusok esetében az enrofloxacin is < 100 µg/kg koncentrációban befolyásolja a talajban élő egyes mikroorganizmusok anyagcsere-mértékét jelző redoxpotenciál változását.

Egyes antibiotikumoknak a talaj mikrobiológiai aktivitására kifejtett hatását számos kísérletben vizsgálták, több módszer használatával (Chander et al., 2005, Kotzerke et al., 2008, Thiele-Bruhn és Beck, 2005, Zielezny et al., 2006). Chander et al. (2005) arról számoltak be, hogy talajhoz adott tetraciklin és tilozin megtartották antimikrobiális aktivitásukat 24 órán keresztül, 37 °C-on laboratóriumi körülmények között. Kotzerke et al., (2008) vizsgálataikban azt tapasztalták, hogy míg a nitrifikációs aktivitást nem befolyásolta szignifikánsan az antibiotikum talajhoz történő hozzáadása, addig a talaj szubsztrát indukált CO₂ termelése csökkent. Ez a hatás idő- és dózisfüggő volt. Thiele-Bruhn és Beck, (2005) vizsgálatainak eredményei azt mutatták, hogy oxitetraciklin 24, illetve 48 óra után is gátolta a szubsztrát indukált CO₂ termelést talajban. Ezek alapján, függően az alkalmazott módszertől, bizonyos paraméterek gátló hatásra utaltak, más esetekben szignifikáns hatást nem lehetett kimutatni. Ezekben a vizsgálatokban többnyire meglehetősen magas koncentrációkban vizsgálták az antibiotikumok lehetséges hatásait. Ugyanakkor a saját vizsgálatainkban a környezetben potenciálisan előforduló mennyiség hatását kívántuk meghatározni. Az egyes vizsgálatok eredményeinek összehasonlítását a talaj mikrobiális állapotának szezonális változása, az adott talaj fizikai, kémiai és biológiai tulajdonságaiban, a vizsgálati körülményekben megnyilvánuló különbségek, illetve a megfelelő referencia értékek hiánya nagymértékben nehezíti (Kumar et al., 2005, Sarmah et al., 2006, Liu et al., 2009, Zielezny

et al., 2006). A kísérletben a kapott adatok más irodalmi adatokhoz való viszonyítását az akadályozza, hogy ezt a vizsgálati módszert, ilyen jellegű vizsgálatra még nem használták, így irodalmi adatok sem állnak rendelkezésre.

Ahogy arról már említést tettünk a doxiciklin talajban való lebomlásának vizsgálatakor, a talaj fiziko-kémiai tulajdonságai nagyban befolyásolják az adott hatóanyag mobilitását, lebomlását, illetve perzisztálását. Ezen talajparaméterek természetesen csökkenthetik, vagy éppen növelhetik az antibiotikum mikrobaellenes hatását, ahogy azt az általunk vizsgált talajtípusok esetében is tapasztalhattuk (Kumar et al., 2005, Sarmah et al., 2006, Liu et al., 2009). Az enrofloxacin bizonyos talajtípusokban (hordalék talaj és vályogtalaj) hatástalan volt, míg a homoktalajban (T1), iszapos-agyagos vályog talajban (T2) és a vulkanikus hamu talajban (T5) 35,0-57,0 µg/kg volt a kalkulált legkisebb hatékony koncentráció. A rendelkezésünkre álló talajokat jellemző paraméterek és a mért adatok összevetése alapján nehéz volt meghatározni azt az adott talaj tulajdonságot, amely az egyes antibiotikumoknál egyértelműen befolyásolhatta a hatóanyag hatását. Ehhez több, a talajt jellemző fizikai-kémiai tulajdonság vizsgálatára lenne szükség. A kísérletben olyan talajtípusokat használtunk, amelyek fizikai-kémiai paraméterei eltérőek voltak, mint azt a dolgozat 10. táblázatának adatai mutatják. A hordaléktalaj és a vályogtalaj (T3 és T4) pH értéke a többi vizsgált talajénál alacsonyabb (pH 3,6-3,8), szerves széntartalma pedig nagyobb (3,1 és 5,1%) volt. Ezek a tényezők jelentősen befolyásolhatják a vizsgált antimikrobiális szer kötődését és ezáltal a mikrobákra gyakorolt hatását. Az enrofloxacin esetében a különböző talajtípusokhoz való kötődés mértéke, a megoszlási együttható értéke (Kd, illetve Koc) irodalmi adatok szerint igen tág határok között, 260-6310, illetve 16500-770000) között változik (Kumar et al, 2005).

A talaj élő és nem élő összetevők együttese, azok összetett, heterogén keveréke, bonyolult kölcsönhatásban, sok ismeretlennel terhelve. Ezért nehéz egyértelmű összefüggéseket találni, magyarázni és meghatározni azt az adott talaj-tulajdonságot, amely az egyes antibiotikumoknál egyértelműen befolyásolhatta a hatóanyag hatását. Így a rendelkezésre álló adatok alapján csak feltételezéseket tudok megfogalmazni azzal, hogy a talajtípus esetleges jelentős hatása jelenség szinten jelenik meg.

Az antibiotikumokat arra fejlesztették ki, hogy bakteriosztatikus vagy baktericid hatást fejtsenek ki a mikroorganizmusokra. Ennek ellenére vizsgálatunkban a hagyományos, szabványos módon meghatározott mikrobaszám nem változott doxiciklin hozzáadása után a talajban egyik vizsgált koncentrációban sem. Ez egyrészt magyarázható lehet a rezisztens baktériumok, illetve a különböző típusú és változatú rezisztenciagének jelenlétével (Kumar et al., 2005, Sarmah et al., 2006, Čermák et al., 2008), másrészt antibiotikum hatására a talaj

mikrobiális szerkezetében és diverzitásában bekövetkező változásával (Westergaard et al., 2001, Thiele-Bruhn és Beck, 2005, Kong et al., 2006, Hammesfahr et al., 2008). Bár a kimutatható mikrobaszám nem mutatott szignifikáns változást, a redoxpotenciál jelentős módosulása a talaj mikroflóra anyagcsere-aktivitásának gátlására utal. Ennek következtében, fontos mikrobiológiai funkciók, mint pl. az antibakteriális maradékanyagok lebontásának mértéke is csökkenhet az antibiotikum tartalmú trágyával kezelt talajokban (Kong et al., 2006).

Mivel a vizsgálatunkban a talaj mikrobiális aktivitásának jellemzésére használt módszer egyszerű, gyors és érzékeny, további kísérletek eredményeinek függvényében célszerűnek tartjuk figyelembe venni esetleges használatát az ökotoxikológiai vizsgálatokban.

8. Új tudományos eredmények

1. Vizsgálatainkban elsőként határoztuk meg a doxiciklin felezési idejét laboratóriumi körülmények között érlelt, illetve üzemi körülmények között komposztált sertéstrágyában. Hasonlóképpen elsőként írtuk le a doxiciklin koncentrációját az előbbi mátrixban az átlagosnak tekinthető 3 hónapos trágyaérlelési periódust követően. Megállapítottuk, hogy az antibiotikum 66,9, illetve 89,3%-a lebomlott a 3 hónapos érlelés során, de így is jelentős mennyiség juthat az érlelt trágyával a szántóföldre.
2. A doxiciklint tartalmazó sertéstrágya szántóföldre történő kijuttatását követően elsőként határoztuk meg a doxiciklin koncentrációjának változását és annak alapján a felezési idejét a talaj különböző mélységében az idő függvényében. Vizsgálataink eredményei arra utalnak, hogy az érlelt trágyával a szántóföldre kijuttatott doxiciklin 20 héttel a trágyázást követően is kimutatható a talaj különböző mélységeiből és az antibiotikum mennyisége a talaj felszínén, illetve 20-25 cm-es mélységben 8 héttel a kijuttatás után még meghaladja a 100 µg/kg-os határértéket.
3. A szakirodalomban elsőként írtuk le a doxiciklin hatását a talajflóra nitrogén transzformációs aktivitására megállapítva, hogy a tetraciklin-származék a talajban lehetséges koncentrációkban átmenetileg számottevően gátolja a mikrobák nitrogéntranszformációját, de a vizsgálat végén, a 28. napon a gátlás mértéke már nem éri el a vonatkozó szakmai irányelv által jelentősnek tekintett küszöbértéket.
4. Elsőként vizsgáltuk a doxiciklin és további két antimikrobiális szer hatását a talaj mikroflórájának anyagcsere-aktivitását jellemző redoxpotenciál alakulására. Megállapítottuk, hogy a doxiciklin, az enrofloxacin és a linkomicin a talajban potenciálisan előforduló koncentrációban növeli a detektációs időt, ami az energiatermelő anyagcsere-folyamatok gátlására utal. A kiváltott hatás erőssége függ a talaj típusától.

9. Irodalom

Alexy R., Kümpel, T., Kümmerer, K.: **Assessment of degradation of 18 antibiotics in the Closed Bottle Test**, Chemosphere, 57. 505–512, 2004.

Arikan, O. A., Sikora, L. J., Mulbry, W., Khan, S. U. and Foster G. D.: **Composting rapidly reduces levels of extractable oxytetracycline in manure from therapeutically treated beef calves**, Bioresour. Technol., 98. 169-176, 2007.

Ashton, D., Hilton, M. Thomas, K.V.: **Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom**, Sci. Total Environ., 333. 167–184, 2004.

Baguer, A. J., Jensen, J., Krogh, P. H.: **Effects of the antibiotics oxytetracycline and tylosin on soil fauna**. Chemosphere, 40. 751-757, 2000.

Bao, Y., Zhou, Q., Guan, L. and Wang, Y.: **Depletion of chlortetracycline during composting of aged and spiked manures**, Waste Manage., 29. 1416–1423, 2009.

Baska F.: **A gyógykezelés korlátai a haltenyésztésben**. A Halászati és Öntözési Kutatóintézet, 2008. májusi XXXII. Halászati Tudományos Tanácskozásán elhangzott előadás kivonata, 2008.

Benbrook, Ch. M.: **Antibiotic drug use in U.S. Aquaculture**, <http://www.healthobservatory.org/library.cfm?RefID=37397>, 2002.

Blackwell, P. A., Kay P., Boxall A. B. A.: **The dissipation and transport of veterinary antibiotics in a sandy loam soil**, Chemosphere, 67. 292-299, 2007.

Blackwell, P. A., Lützhøft, HC. H., Ma, HP., Halling-Sørensen, B., Boxall A. B. A., Kay, P.: **Ultrasonic extraction of veterinary antibiotics from soils and pig slurry with SPE clean-up and LC–UV and fluorescence detection**. Talanta, 64, 1058-1064, 2004.

Boxall, A. B., Kolpin, D. W., Tolls, J.: **Are veterinary medicines causing environmental risks?** Environ. Sci. Technol.,. 37. 286–294, 2003.

Boxall AB, Fogg LA, Kay P, Blackwel PA, Pemberton EJ, Croxford A.: **Prioritisation of veterinary medicines in the UK environment**, Toxicol. Lett., 142. 207-218, 2003.

Boxall, A. B. A., Fogg, L. A., Baird, D. J., Lewis, C., Telfer, T. C., Kolpin, D., Gravel, A.: **Targeted monitoring study for veterinary medicines in the UK environment**. Final Report to the UK Environment Agency, 2005.

Capleton A. C., Courage C., Rumsby P., Holmes P., Stutt E., Boxall A. B.A. and Levy L. S.: **Prioritising veterinary medicines according to their potential indirect human exposure and toxicity profile**, *Toxicol. Lett.* 163. 213-223, 2006.

Čermák, L., Kopecký, J., Novotná, J., Omelka, M., Parkhomenko, N., Plháčková K., Ságová-Marečková, M.: **Bacterial communities of two contrasting soils reacted differently to lincomycin treatment**, *Applied Soil Ecology*, 40. 348-358, 2008.

Chander, Y., Kumar, K., Goyal, S. M., Gupta, S. C.: **Antibacterial activity of soil-bound Antibiotics**, *J. Environ. Qual.*, 34. 1952-1957, 2005.

CVMP (1999a): **Guideline on Validation of Analytical Procedures: Definition and Terminology**. VICH GL1 CVMP/VICH/590/98-Final. 1999.

CVMP (1999b): **Guideline on Validation of Analytical Procedures: Methodology**. VICH GL2 CVMP/VICH/591/98-Final. 1999.

CVMP (2000): **Guideline on Environmental Impact Assessment (EIAs) for Veterinary Medicinal Products—Phase I**. VICH GL6 CVMP/VICH/592/98 – Final. 2000.

CVMP (2003): **Guideline on Environmental Impact Assessment (EIAs) for Veterinary Medicinal Products—Phase II**. VICH GL38. CVMP/VICH/790/03 – Final. 2003.

CVMP (2008): Revised **Guideline on environmental impact assessment for veterinary medicinal products in support of the VICH guidelines GL6 and GL38**. EMEA/CVMP/ERA/418282/2005 – Rev. 1. 2008.

CVMP (2011): **Guideline on determining the fate of veterinary medicinal products in manure – Final**, EMA/CVMP/ERA/430327/2009.

Deák, T.: **Élelmiszermikrobiológia**. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 2006.

De Liguoro, M., Cibir, V., Capolongo, F., Halling-Sørensen, B., Montesissa, C.: **Use of oxytetracycline and tylosin in intensive calf farming: evaluation of transfer to manure and soil**, *Chemosphere*, 52. 203-212, 2003.

Fernández C., Alonso C., Babín M. M., Pro J., Carbonell G., Tarazona J. V.: **Ecotoxicological assessment of doxycycline in aged pig manure using multispecies soil systems**, *Sci. Total Environ.*, 323. 63-69, 2004.

Gallo-Torres, H.E.: Proc. **Symposium on Biological Models to Determine the Safety of Bound Residues in the Tissues of Food Producing Animals**, Washington, D.C., *Drug. Metab. Rev.*, 22. 585-919, 1990.

Gavalchin J., Katz, S.E.: **The persistence of fecal-borne antibiotics in soil**, *J. AOAC Int.*, 177. 481–485, 1994.

Haller, M. Y., Müller, S. R., McArdeell, C. S., Alder, A. C., Suter, M. J. -F.: **Quantification of veterinary antibiotics (sulfonamides and trimethoprim) in animal manure by liquid chromatography–mass spectrometry**, *Chromatogr. A.*, 952. 111-120, 2002.

Halley, B. A., VandenHeuvel, W. J. A., Wislocki, P. G.: **Environmental effects of the usage of avermectins in livestock**, *Vet. Parasitol.*, 48. 109-125, 1993.

Halling-Sørensen, B.: **Inhibition of aerobic growth and nitrification of bacteria in sewage sludge by antibacterial agents**, *Environ. Contam. Tox.*, 40. 451-460, 2001.

Hammesfahr, U., Heuer, H., Manzke, B., Smalla K., Thiele-Bruhn S.: **Impact of the antibiotic sulfadiazine and pig manure on the microbial community structure in agricultural soils**, *Soil Biol. Biochem.*, 40. 1583-1591, 2008.

Hamscher, G., Pawelzick, H. T., Höper, H., Nau, H.: **Different behaviour of tetracyclines and sulfonamides in sandy soils after repeated fertilization with liquid manure**, *Environ. Toxicol. Chem.*, 24. 861-868, 2005.

Hamscher, G., Sczesny, S., Abu-Qare A., Höper H., Nau H.: **Substances with pharmacological effects including hormonally active substances in the environment: identification of tetracyclines in soil fertilized with animal slurry**, *Dtsch. Tierarztl. Wschr.*, 107. 332-334, 2000.

Hamscher, G., Sczesny, S., Höper, H., Nau, H.: **Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry**, *Anal. Chem.*, 74. 1509-1518, 2002.

Hirsch, R., Ternes, T., Haberer K., Kratz K.,L.: **Occurrence of antibiotics in the aquatic environment**, *Sci. Total Environ.*, 225. 109–118, 1999.

Hollender, J., Althoff, K., Mundt, M. Dott, W.: **Assessing the microbial activity of soil samples, its nutrient limitation and toxic effects of contaminants using a simple respiration test**. *Chemosphere*, 53. 269-275, 2003.

Höper, H., Kues, J., Nau, H., Hamscher, G.: **Eintrag und Verbleib von Tierarzneimittelwirkstoffen in Böden**, *Bodenschutz*, 7. 141-148, 2002.

Hund-Rinke K., Simon M.: **Bioavailability assessment of contaminants in soils via respiration and nitrification tests**, *Environ. Pollut.*, 153. 468-475, 2002.

Ingerslev, F., Halling-Sørensen, B.: **Biodegradability of metronidazole, olaquinox, and tylosin and formation of tylosin degradation products in aerobic soil–manure slurries**, *Ecotox. Environ. Safe.*, 48. 311-320, 2001.

ISO14256-1: **Soil quality – Determination of nitrate, nitrite and ammonium in field-moist soils by extraction with potassium chloride solution – Part 1: Manual method**, 2003.

Jensen V. F., Hammerum, A. M., (eds.): *Danmap (Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme), Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark*, <
http://www.danmap.org/Downloads/~/media/Projekt%20sites/Danmap/DANMAP%20reports/Danmap_2009.ashx >, 2009.

Jozwiak Á., Reichart O., Szakmár K.: **Redoxpotenciál-méréseken alapuló gyorsmódszer *Campylobacter jejuni* hıpusztulásának vizsgálatára**. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 132. 47-53, 2010.

Kay, P., Blackwell, P.A., Boxall, A. B. A.: **Transport of veterinary antibiotics in overland flow following the application of slurry to arable land**, *Chemosphere*, 59. 951–959, 2005.

Kemper, N.: **Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment**, *Ecol. Indic.*, 8. 1-13, 2008.

Kolpin, D., Furlong, E., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B., Buxton, H. T.: **Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S.**

streams, 1999–2000: a national reconnaissance, Environ. Sci. Technol., 36. 1202–1211, 2002.

Kong, W.-D., Zhu, Y.-G., Fu, B.-J., Marschner, P., He, J.-Z.: **The veterinary antibiotic oxytetracycline and Cu influence functional diversity of the soil microbial community**, Environ. Pollut., 143. 129-137, 2006.

Korsgaard H., Hammerum, A. M., (eds.): Danmap (Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme), **Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark**, <
http://www.danmap.org/Downloads/~media/Projekt%20sites/Danmap/DANMAP%20reports/Danmap_2010.ashx >, 2010.

Kotzerke, A., Sharma, S., Schauss, K., Heuer, H., Thiele-Bruhn, S., Smalla, K., Wilke B.-M., Schloter, M.: **Alterations in soil microbial activity and N-transformation processes due to sulfadiazine loads in pig-manure**, Environ. Pollut., 153. 315–322, 2008.

Kumar, K., Gupta, S. C., Chander, Y., Singh, A. K.: **Antibiotic Use in Agriculture and Its Impact on the Terrestrial Environment**, Advances in Agronomy, 87. 1-54, 2005.

Kühne, M., Ihnen, D., Möller, G., Agthe, O.: **Stability of Tetracycline in Water and Liquid Manure**. J. Vet. Med., Series A, 47. 379-384, 2000.

Kümmerer K.: **Pharmaceuticals in the environment**, Berlin, Heidelberg, New York, Springer, ISBN 3-540-21342-2, 2004.

Liu, F., Ying, G.G., Tao, R., Zhao, J.L., Yang, J.F., Zhao L.F.: **Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities**, Environ. Pollut., 157. 1636-1642, 2009.

Loke, M. L., Ingerslev, F., Halling-Sørensen, B., Tjørnelund, J.: **Stability of tylosin A in manure containing test systems determined by high performance liquid chromatography**, Chemosphere, 40. 759-765, 2000.

Loke, M-L., Jespersen, S., Vreeken, R., Halling-Sorensen, B., Tjornelund, J.: **Determination of oxytetracycline and its degradation products by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in manure-containing anaerobic test systems**, J. Chromatogr. B., 783. 11-23, 2003.

Lokke, H., van Gestel, C. A. M.: **Handbook of Soil Invertebrate Toxicity Tests**, John Wiley & Sons, Chichester, ISBN 0471971030, 1998.

MacDonald, A.: **Identifying the „residue of toxicological concern”- bioavailability and bioactivity testing**, Drug. Metab. Rev., 27. 549-556, 1995.

Martínez-Carballo, E., González-Barreiro, C., Scharf, S., Gans, O.: **Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria**, Environ. Pollut., 148. 570-579, 2007.

Mellon, M., Benbrook, Ch.: **Hogging It: Estimates of Antimicrobial Abuse in Livestock**, Union of Concerned Scientists: Cambridge, MA, 2001. www.ucsusa.org/publications.

OECD Guidelines for Testing of Chemicals: Test Guideline 106: **Adsorption/desorption Using a Batch Equilibrium Method**. Revised Draft Document, OECD, Paris, pp. 45, 1997.

OECD Guidelines for Testing of Chemicals: Test Guideline 207: **Earthworm Acute Toxicity Test**, OECD, Paris, p. 9, 1984.

OECD Guidelines for Testing of Chemicals: Test Guideline 216, **Soil Microorganisms: Nitrogen Transformation Test**, 2000.

Rabølle, M., Spliid, N. H.: **Sorption and mobility of metronidazole, olaquinox, oxytetracycline and tylosin in soil**, Chemosphere, 40. 715-722, 2000.

Reichart O., Nagy B., Jozwiak Á., Szakmár K.: **Rapid method for selective enumeration of 'Bifidus essensis' in Activia yogurts**. Acta Alimentaria, 36. 173-183, 2007a.

Reichart, O. Szakmár, K., Jozwiak, Á., Felföldi J., Baranyai L.: **Redox potential measurement as a rapid method for microbiological testing and its validation for coliform determination**, Int. J. Food Microbiol., 114. 143-148, 2007b.

Roberts, G. C., Peuron, F., Penwell, A. J.: **Assessing the toxic effect on nitrapyrin on nitrogen transformation**, Soil Biol. Biochem., 35. 479-481, 2002.

Roig, B.: **Pharmaceuticals in the Environment**, London, Alliance House, IWA Publishing, ISBN 9781843393146, 2010

Sacher, F., Lange, F. T., Braucha, H.-J., Blankenhorn, I.: **Pharmaceuticals in groundwaters. Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg**, Germany. J. Chromatogr. A, 938. 199–210, 2001.

Sarmah, A. K., Meyer M. T., Boxall A. B. A.: **A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment**; Chemosphere, 65. 725-759, 2006.

Schlüsener, M. P., Spiteller, M., Bester, K.: **Determination of antibiotics from soil by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry**, Chromatogr. A, 1003. 21-28, 2003.

Schmitt, H., Haapakangas H., van Beelen P.: **Effects of antibiotics on soil microorganisms: time and nutrients influence pollution-induced community tolerance**, Soil Biol. Biochem., 37. 1882-1892, 2005.

Semjén Gábor, dr., Laczay Péter, dr.: **Állatorvosi gyógyszerteran II.**, Budapest, 1998.

Shoemaker, N. B., Vlamakis, H., Hayes, K., Salyers, A. A.: **Evidence for extensive resistance gene transfer among Bacteroides sp. and among Bacteroides and other genera in the human colon**, Appl. Environ. Microbiol., 67. 561–568, 2001.

Sunderland, J., Lovering, A. M., Tobin, C. M., MacGowan, A. P., Roe, J. M., Delsol, A. A.: **Determination by HPLC of chlortetracycline in pig faeces**. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 52. 135-137, 2003.

Szokmár K., Reichart O., Jozwiak Á.: **Microbiological quality control of food industrial samples by redoxpotential measurement**. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 52. 342, 2006.

Szili-Kovács, T., Takács, T.: **A talajminőség mikrobiológiai indikációja: lehetőségek és korlátok**. Talajvédelem különszám, 321-328, 2008.

Thiele-Bruhn S., Beck I.C.: **Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass**, Chemosphere, 59. 457–465, 2005.

Thiele-Bruhn, S.: **Pharmaceutical antibiotic compounds in soil – a review**, Plant Nutr. Soil Sci., 166. 145 – 167, 2003.

Wessberg, N., Molarius, R., Seppälä, J., Koskela, S., Pennanen, J.: **Environmental risk analysis for accidental emissions**, Chem. Health Safety, 2008. 15. 24-31.

Westergaard, K., Müller, A. K., Christensen, S., Bloem, J. Sørensen, S. J.: **Effects of tylosin as a disturbance on the soil microbial community**, Soil Biol. Biochem., 33. 2061-2071, 2001.

Winckler, C., Grafe, A.: **Use of veterinary drugs in intensive animal production: Evidence for persistence of tetracycline in pig slurry**, Soils Sedim., 2. 66-70, 2001.

Zielezny, Y., Groeneweg, J., Vereecken, H., Tappe W.: **Impact of sulfadiazine and chlorotetracycline on soil bacterial community structure and respiratory activity**, Soil Biol. Biochem., 38. 2372-2380, 2006.

10. Saját publikációk

Publikációk:

Szatmári I., Laczay P.: **Állatgyógyszerek előfordulása és sorsa a környezetben.**

Áttekintés. Magyar Állatorvosok Lapja 131, 106-114., 2009. (IF: 0,200)

Kiss R., Szita G., Herpay M., Csikó Gy., Pászti J., Mag T., Szita J., Tóth P., Szatmári I., Bernáth S.: **The isolation of verocytotoxin-producing Escherichia coli (VTEC) strains**

from improperly pasteurised cow's milk samples. ACTA ALIMENTARIA 40, 32-37., 2011.

(IF: 0,379*)

Kiss R., Szita G., Herpay M., Csikó Gy., Pászti J., Mag T., Kovács P., Kovács G., Szita J., Tóth P., Szatmári I., Bernáth S.: **Verotoxintermelő Escherichia coli (VTEC) izolálása nem**

megfelelően pasztörözött tehéntejből. Magyar Állatorvosok Lapja 133, 303-306., 2011.

(IF: 0,300*)

Szatmári I., Laczay P., Borbély Zs.: **Degradation of Doxycycline in Aged Pig Manure.**

ACTA VETERINARIA HUNGARICA 59, 1-10., 2011. (IF: 1,264*)

Szatmári I., Barcza T., Sz. Körmöczy P., Laczay P.: **Ecotoxicological assessment of doxycycline in soil.** Journal of Environmental Science and Health, Part B 47, 129-135.,

2012. (IF: 1,119*)

Előadások:

Szatmári I., Laczay P.: **Állatgyógyászati készítmények környezet-toxikológiai jelentősége.** Akadémiai Beszámolók SzIE ÁOTK, 2006

Szatmári I.: **Doxiciklin lebomlása sertéstrágyában.** Akadémiai Beszámolók SzIE ÁOTK, 2007

Szatmári I., Barcza T.: **Doxiciklin lebomlása talajban.** Akadémiai Beszámolók SzIE ÁOTK, 2010

Szatmári I., Laczay P., Szakmár K. és Schneider O.: **Doxiciklin antimikrobiális hatása a talajban.** Akadémiai Beszámolók SzIE ÁOTK, 2011

11. Mellékletek

M/1. táblázat Visszanyerés – Doxiciklin koncentráció meghatározása trágyából

Nominális koncentráció (µg/kg)	Visszanyerés mértéke (%)			Átlag ± szórás (%)	CV %
	1	2	3		
500	51,1	46,5	54,4	50,7±3,9	7,8
1000	59,3	60,0	61,2	60,9±0,9	1,5
2000	58,3	62,5	61,5	60,8±2,2	3,6

M/2. táblázat Ismételhetség – Doxiciklin koncentráció meghatározása trágyából

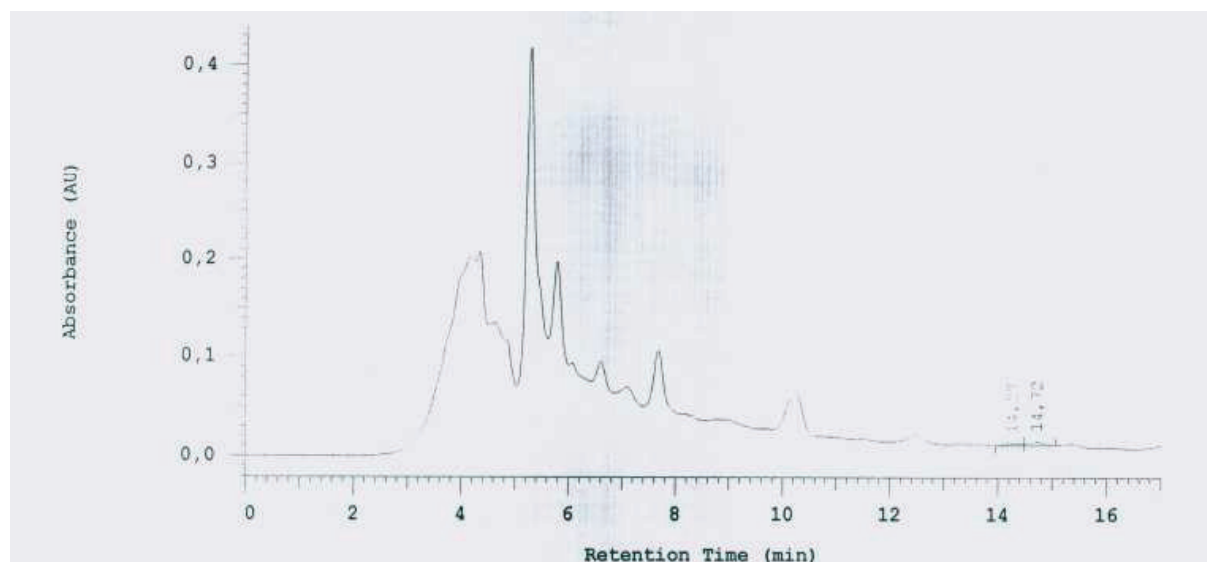
Nominális koncentráció (µg/kg)	Mért koncentráció (µg/kg)			Átlag ± szórás (µg/kg)	CV %	Pontosság (%)
	1	2	3			
500	377,9	341,4	403,6	374,3±31,3	8,4	-25,1
1000	915,1	925,9	944,4	928,5±14,8	1,6	-7,2
2000	1871,2	1960,5	1928,9	1920,2±45,3	2,4	-4,0

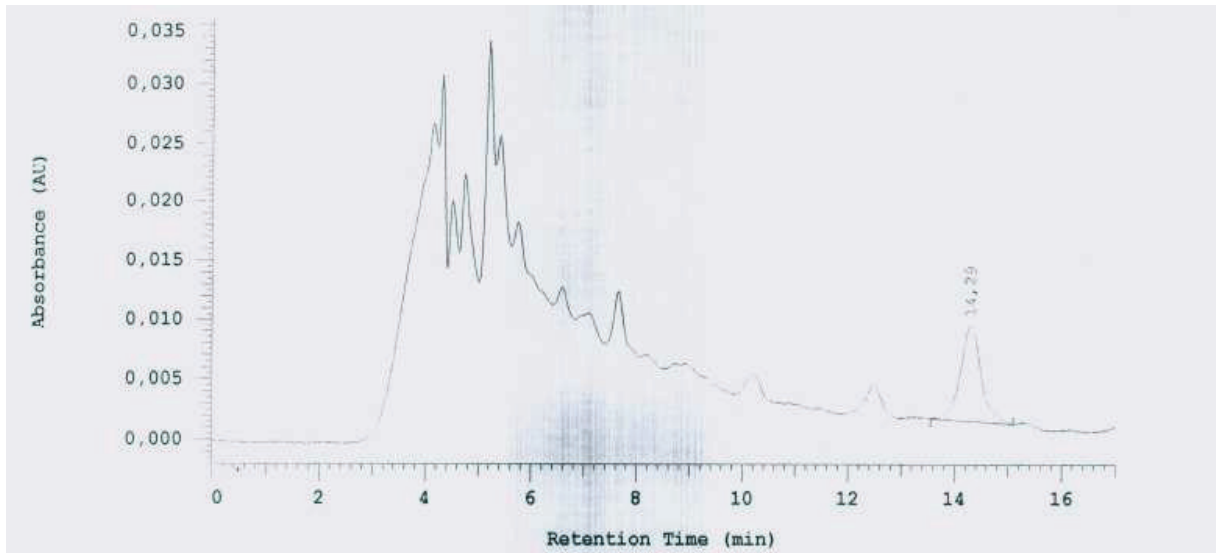
M/3. táblázat Doxiciklin stabilitása trágya mintákban

Nominális koncentráció (µg/kg)	Mért koncentráció (µg/kg)			Átlag ± szórás (µg/kg)	CV %	'0'-tól való eltérés (%)
	1	2	3			
5000/0. nap	5543,2	5607,3	5811,1	5653,9±139,9	2,5	0,0
5000/46. nap	5308,7	5684,4	5780,9	5591,3±249,5	4,5	-1,1

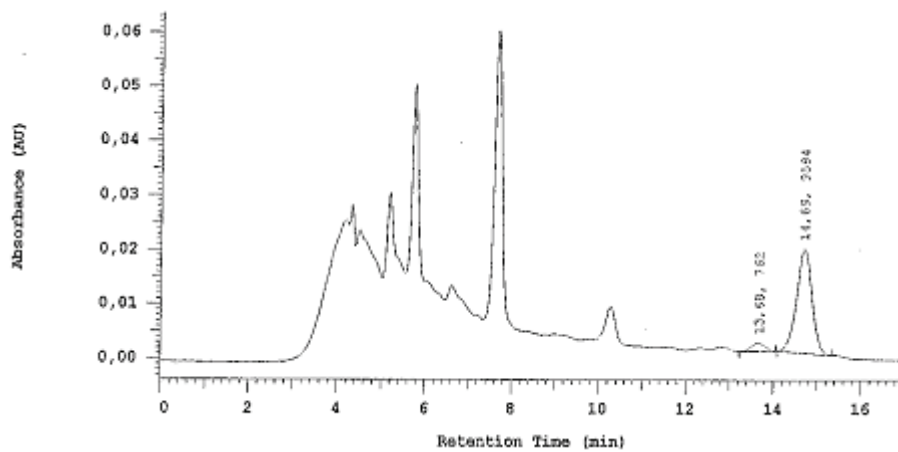
M/4. táblázat Visszanyerés – Doxiciklin koncentráció meghatározása talajból

Nominális koncentráció (µg/kg)	Visszanyerés mértéke (%)						Átlag ± szórás (%)	CV %
	1	2	3	4	5	6		
30	50,4	77,7	123,1	101,2	64,4	114,7	88,6±29,0	32,7
59	62,3	94,6	87,4	71,7	70,6	68,3	75,8±12,4	16,4
119	57,2	73,8	56,4	69,6	71,9	72,7	66,9±8,0	11,9

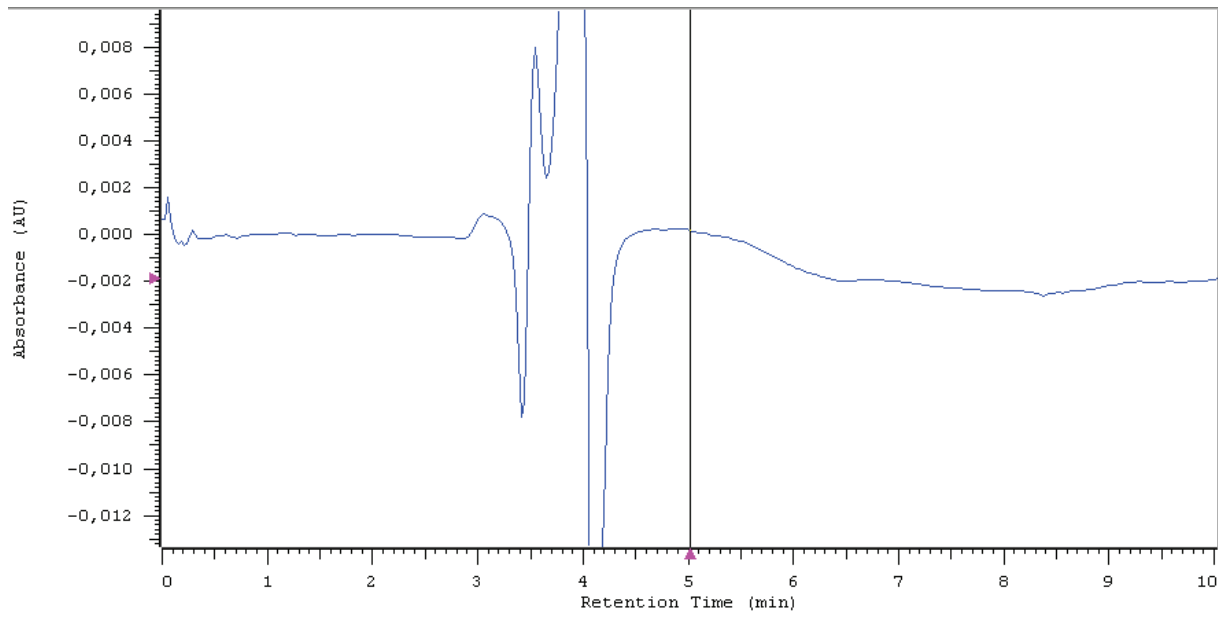
**M/1. ábra** Kromatogram A: Kontroll trágyaminta



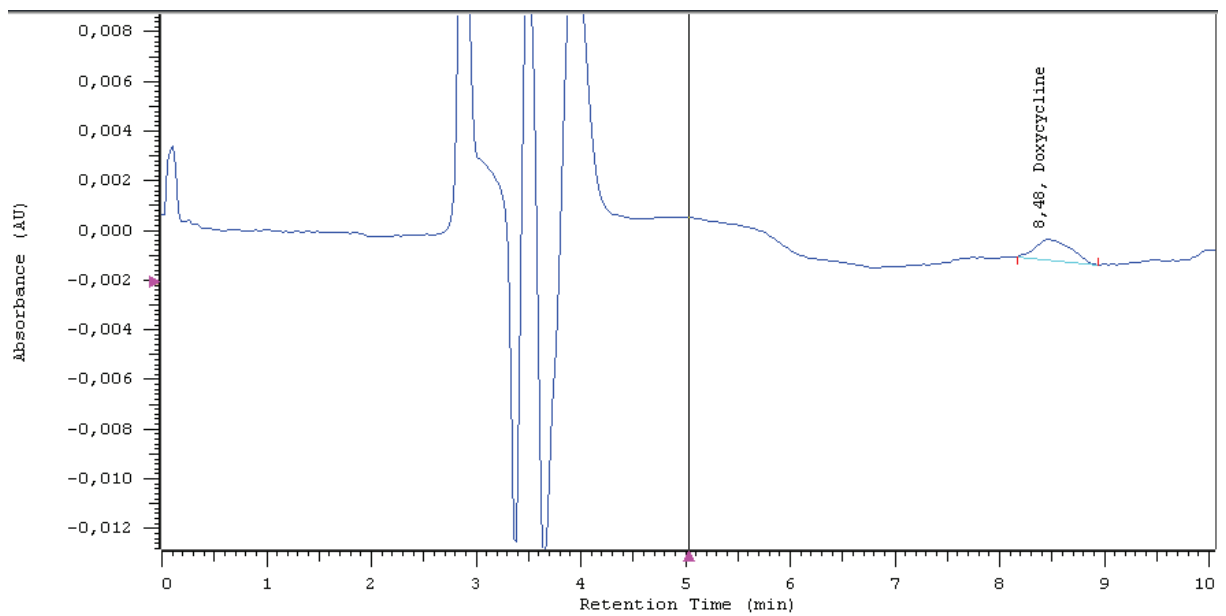
M/2. ábra Kromatogram B: doxiciklinnel kevert, kezeltlen trágyaminta



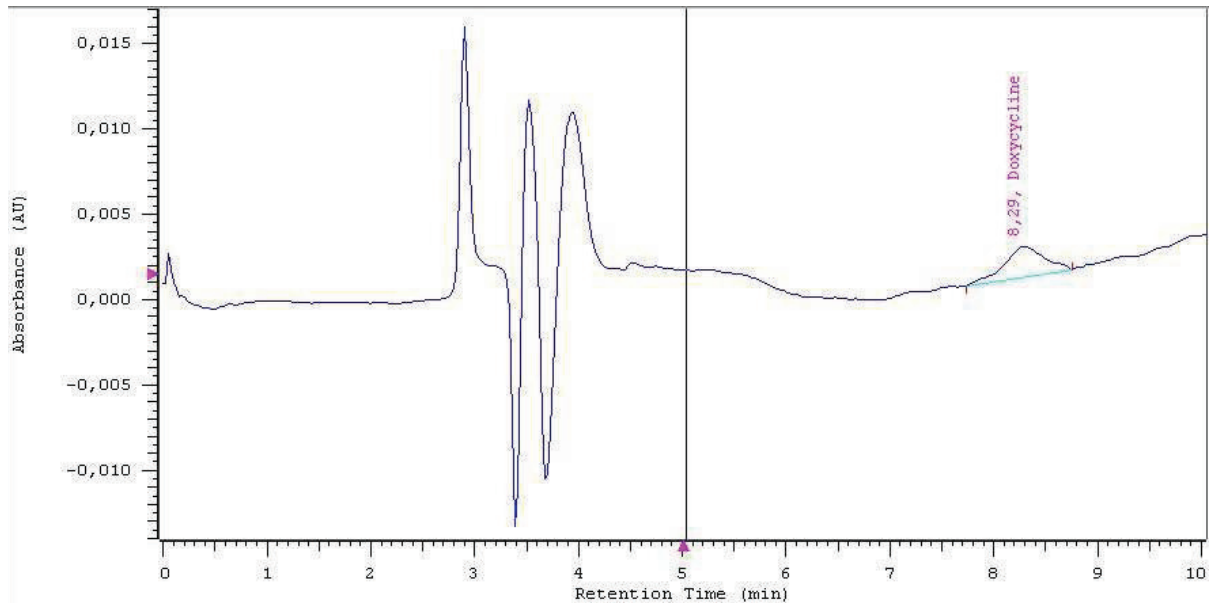
M/3. ábra Kromatogram C: éles minta trágyából



M/4. ábra Kromatogram D: Kontroll talajminta a talaj felszínéről

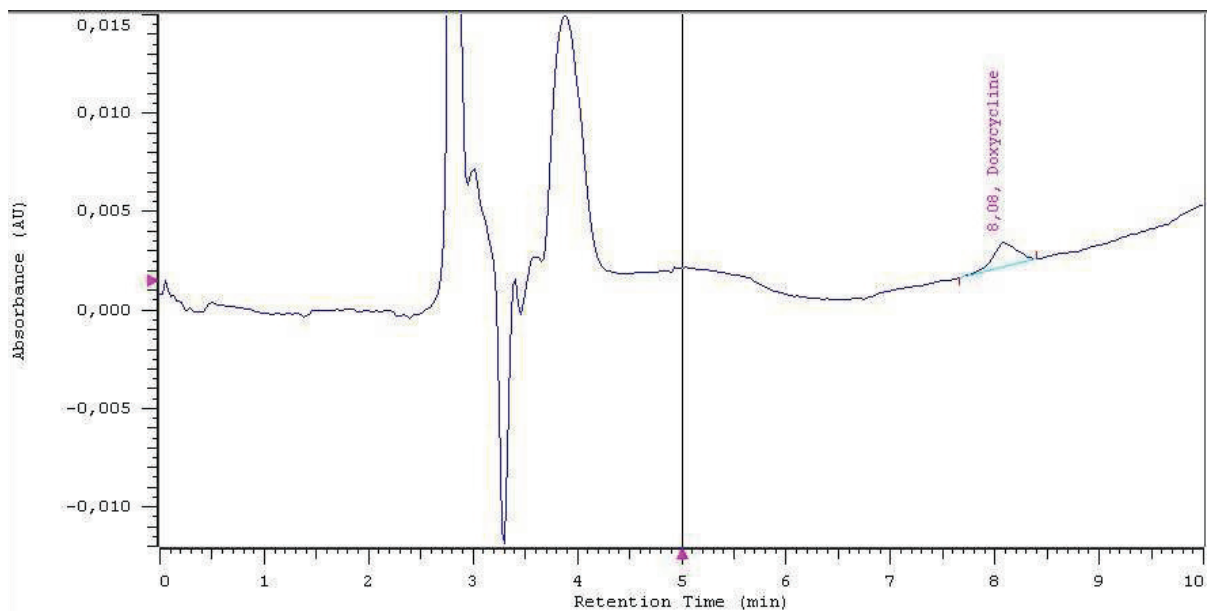


M/5. ábra Kromatogram E: doxiciklinnel kevert, kezeltetlen talajminta



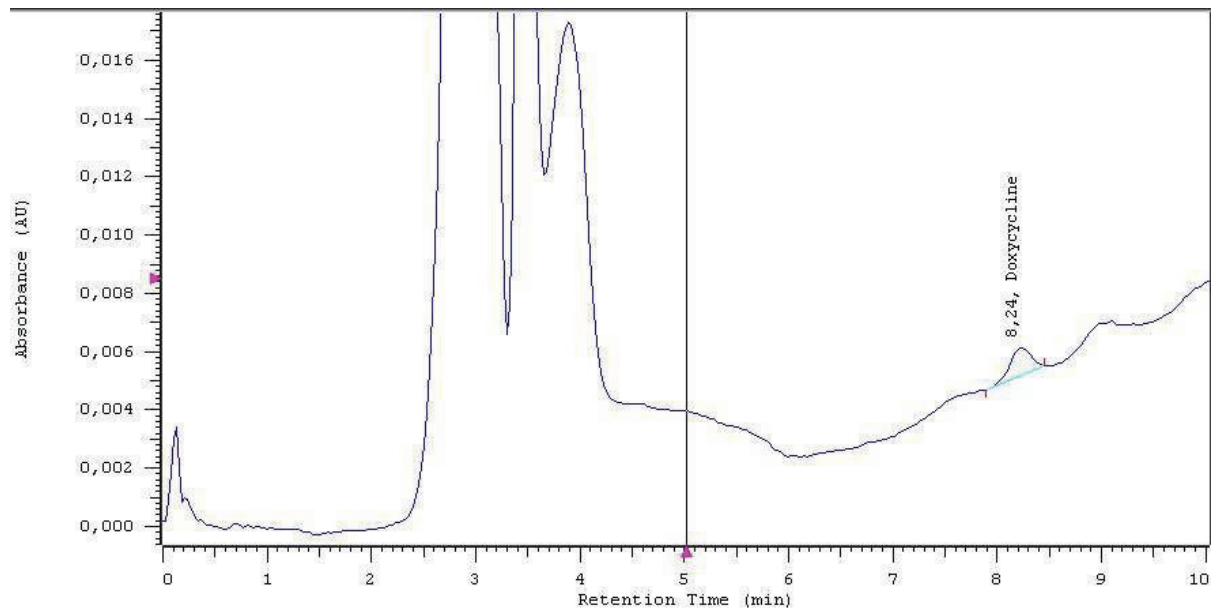
M/6. ábra

Kromatogram F: talajminta a trágyázott talajból a beszántást követően
a 0. héten



M/7. ábra

Kromatogram G: talajminta a trágyázott talajból a beszántást követően
a 14. héten

**M/8. ábra**

Kromatogram H: talajminta a trágyázott talajból a beszántást követően
a 20. héten

11.1 Az eredmények statisztikai értékelés

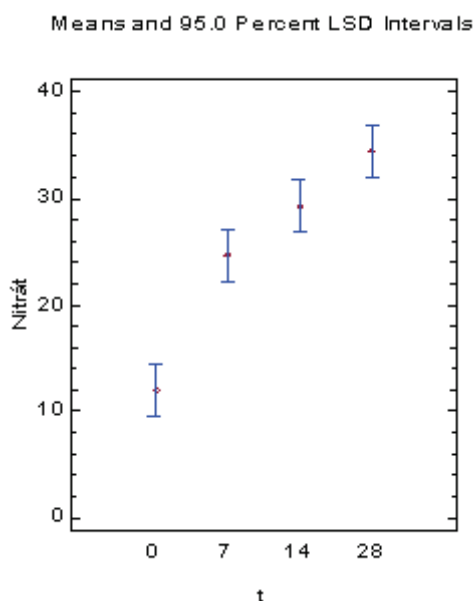
11.1.1. Nitrogén transzformációs vizsgálat

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:t	4955.59	3	1651.86	30.36	0.0000
B:C	1633.16	5	326.632	6.00	0.0001
RESIDUAL	3427.85	63	54.4103		
TOTAL (CORRECTED)	10016.6	71			

Ha $p < 0.05$, akkor az idő és/vagy a koncentráció hatása statisztikailag szignifikáns (esetünkben mindkettő szignifikáns).

A nitrát koncentráció változása az idő függvényében:

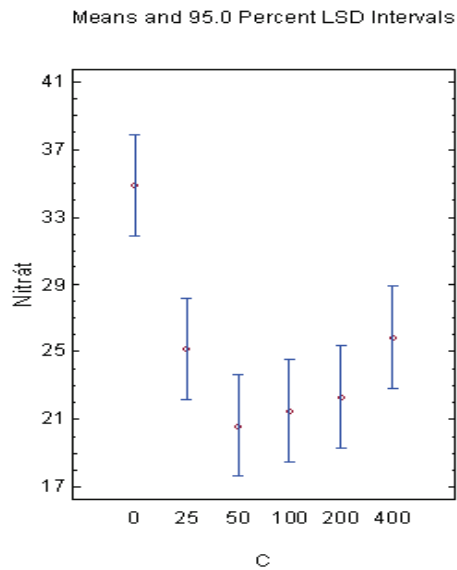
Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
0 - 7	*	-12.6556	4.91348
0 - 14	*	-17.25	4.91348
0 - 28	*	-22.3889	4.91348
7 - 14		-4.59444	4.91348
7 - 28	*	-9.73333	4.91348
14 - 28	*	-5.13889	4.91348



A táblázatban a csillagok szignifikáns különbségeket jelölnek az egyes időpontok között.

A nitrát koncentráció változása a doxiciklin mennyiségének függvényében:

Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
0 - 25	*	9.70833	6.01777
0 - 50	*	14.2083	6.01777
0 - 100	*	13.3333	6.01777
0 - 200	*	12.5417	6.01777
0 - 400	*	9.01667	6.01777
25 - 50		4.5	6.01777
25 - 100		3.625	6.01777
25 - 200		2.83333	6.01777
25 - 400		-0.691667	6.01777
50 - 100		-0.875	6.01777
50 - 200		-1.66667	6.01777
50 - 400		-5.19167	6.01777
100 - 200		-0.791667	6.01777
100 - 400		-4.31667	6.01777
200 - 400		-3.525	6.01777



A táblázatban a csillagok szignifikáns különbségeket jelölnek az egyes koncentrációk között.

11.1.2. Antibiotikumok talajlakó mikroorganizmusokra kifejtett hatásainak vizsgálata a redoxpotenciál-változás mérésén keresztül

Doxiciklin

Talaj	Az egyenes egyenlete	r	Rkrit (P%=5; FG =2)
T1	$TTD = 8,8762 \cdot \lg C - 11,612$	0,9972	0,9500
T2	$TTD = 6,5508 \cdot \lg C - 8,295$	0,9757	
T3	$TTD = 4,4082 \cdot \lg C - 0,8414$	0,9888	
T4	$TTD = 13,362 \cdot \lg C - 20,614$	0,9918	
T5	$TTD = 2,0662 \cdot \lg C + 4,0359$	0,9790	

Valamennyi egyenlet 95 % valószínűséggel szoros, lineáris összefüggést mutat.

Enrofloxacin

Talaj	Az egyenes egyenlete	r	Rkrit (P%=5; FG =2)
T1	$TTD = 2,3962 \cdot \lg C - 0,1924$	0,9993	0,9500
T2	$TTD = 0,6467 \cdot \lg C + 2,79$	0,9730	
T3	$TTD = -0,2613 \cdot \lg C - 5,3843$	0,1783	
T4	$TTD = 2,6387 \cdot \lg C + 1,9442$	0,7297	
T5	$TTD = 5,1667 \cdot \lg C - 1,8317$	0,9645	

A T3 és T4 talajoknál nincs lineáris összefüggés. A regresszió-analízis alapján a két egyenes meredeksége nem különbözik szignifikánsan 0-tól. Ezekben az esetekben az antibiotikum hatástalannak bizonyult.

Linkomicin

Talaj	Az egyenes egyenlete	r	Rkrit (P%=5; FG =2)	Rkrit (P%=10; FG =2)
T1	$TTD = 2,1892 \cdot \lg C + 1,1617$	0,9687	0,9500	0,9000
T2	$TTD = 2,2146 \cdot \lg C + 0,4324$	0,9677		
T3	$TTD = 1,8941 \cdot \lg C + 0,6961$	0,9410		
T4	$TTD = 3,0451 \cdot \lg C + 2,6598$	0,9779		
T5	$TTD = 3,4581 \cdot \lg C + 0,3887$	0,9811		

A T3 egyenlet 90%, a többi 95 % valószínűséggel szoros, lineáris összefüggést mutat.

Köszönetnyilvánítás

Értekezésemhez kapcsolódó munkám során nyújtott segítségért, a téma kidolgozásáért, konzultációkért és támogatásért szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Laczay Péternek, továbbá Dr. Székely Körmöczy Péternek, Dr. Szakmár Katalinnak, Dr. Füleky Györgynek, Dr. Lehel Józsefnek, Barcza Tibornak és a SZIE-ÁOTK Élelmiszer higiéniai Tanszék laboratóriumi dolgozóinak, hogy nagyban hozzájárultak a munkám sikerességéhez.