

**Szent István Egyetem**  
**Állatorvos-tudományi Doktori Iskola**

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

PhD értekezés tézisei

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

## Bevezetés, célkitűzések

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.

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.

Az állatgyógyászati készítmények törzskönyvezése során azok környezettoxikológiai értékelését 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 környezettoxikológiai 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.

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 környeztoxikológiai 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. A doxiciklin környezetben való viselkedéséről, a trágyában és a talajban való lebomlásának mértékéről, valamint a talaj mikroflórájára gyakorolt hatásairól ugyanakkor alig rendelkezünk információval.

Az értekezésben bemutatásra kerülő vizsgálataink során ezért a doxiciklin lebomlásának mértékét vizsgáltuk különböző körülmények között sertéstrágyában, 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 mikroorganizmusok életműködésére, azok anyagcsere-aktivitására.

## Anyag és módszer

A doxiciklin sertéstrágyában való lebomlásának mértékét két kísérletben vizsgáltuk. Mindkét esetben az állatokat doxiciklin tartalmú készítménnyel kezeltük és a keletkezett trágyát összegyűjtöttük. Az *in vitro* trágyaérleléses vizsgálatban a trágyát 300 ml-es, biokémiai oxigénigény (BOD) vizsgálatára szolgáló üvegedényekbe helyeztük, majd lezártuk azokat és  $20 \pm 3,5$  °C-on tároltuk, fenntartva a jelzett hőmérsékletet, valamint a megfelelő nedvességtartalmat és anaerob viszonyokat a vonatkozó irányelveknek (CVMP, 2008, CVMP, 2011) megfelelően, a 16 hetes érlelés teljes időtartama alatt. 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 másik trágyalebomlásos vizsgálatban a trágyát telepi körülmények között érleltük a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar Üllői Tangazdaságában. 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. 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. A mintákat a feldolgozásig mindkét vizsgálat esetében  $-30$  °C-on tároltuk.

A trágyamintákból a doxiciklin koncentrációjának meghatározását a SZIE ÁOTK Élelmiszer-higiéniai Tanszékének Élelmiszer-toxicológiai Laboratóriumában végeztük. Ennek során a doxiciklin különböző biológiai mátrixokból (vérplazma, máj, vese, bőr-zsír, izom, stb.) történő folyadékkromatográfiás analízisére 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. Az analitikai módszer validálását az Európai Gyógyszerügynökség vonatkozó szakmai irányelvei alapján végeztük. A vizsgált validálási paraméterek: specifikusság, linearitás, visszanyerés, laboratóriumon belüli ismételhetőség és pontosság, kimutatási és mennyiségi meghatározási határ, valamint stabilitás.

Doxiciklin talajban való degradációját a trágyaérleléses vizsgálat folytatásaként vizsgáltuk. A doxiciklinnel kezelt sertésektől 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 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 talajminták doxiciklin koncentrációjának meghatározása szilárd fázisú extrakcióval, majd ezt követően nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás eljárással történt. Egy az irodalomban leírt tetraciklin talajból való kimutatására kifejlesztett módszert adaptáltunk és validáltunk a talajmintákban található doxiciklin kimutatására. A vizsgált validálási paraméterek: specifikusság, linearitás, visszanyerés, kimutatási és mennyiségi meghatározási határ.

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 nitrogén transzformációs vizsgálatot az OECD 216 sz. irányelve szerint végeztük. A kísérletben használt talaj ugyanarról a mezőgazdasági területről származott, amelyen a korábban említett talajban történő lebomlási vizsgálatokat végeztük. A doxiciklint desztillált vízben oldva, 5 különböző mennyiségben adtuk hozzá az egyes talajmintákhoz a következők szerint: 25, 50, 100, 200, 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , majd alaposan átkevertük. A talajmintákhoz lucerna lisztet adagoltunk 5 g/kg mennyiségben, amely szerves tápanyagként szolgált a mikroorganizmusok számára. A talajminták inkubációját szobahőmérsékleten ( $20 \pm 2$  °C), sötétben, 28 napig végeztük. A talaj nedvességtartalmát a kísérlet alatt desztillált vízzel tartottuk fenn. A talajok doxiciklinnel történő kezelése előtt (0. nap), majd azt követően a 7. a 14. és a 28. napon vettünk talajmintát. A talajmintákat 0,1M KCl oldattal extraháltuk és 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. A következő lépésben a nitritből egy diazo vegyületet képeztünk savas környezetben szulfanilamid és  $\alpha$ -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.

Egy további kísérletsorozatban a doxiciklin és további két antimikrobiális szer hatását vizsgáltuk a talaj mikroflórájának anyagcsere-aktivitását tükröző redoxpotenciál alakulására. A vizsgálatban öt különböző talajtípust használtunk és a doxiciklin talajlakó mikroorganizmusokra kifejtett hatását összehasonlítottuk két más csoportba (fluoroquinolon, illetve linkozamid) tartozó hatóanyagéval is. A vizsgálatban a korábbi kísérletekben használt talaj mellett olyan talajtípusokat használtunk, amelyek főbb tulajdonságaikban eltérnek 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 egyes talajmintákhoz hozzáadtuk az említett antibiotikumokat desztillált vízben oldva, különböző koncentrációkban. Négy koncentrációt alkalmaztunk: 200, 400, 800 és 1600 µg/kg talaj mennyiségben, valamint kontrollként antibiotikumot nem tartalmazó desztillált vizet használtunk. Az antibiotikumokat tartalmazó oldatokat 25 ml-re egészítettük ki desztillált vízzel és hozzákevertük 10 g talajhoz. Ebből a vizes talajmintákból vettünk ki egy-egy ml-t és adtuk hozzá 9 ml folyékony táptalajhoz a redoxpotenciál-változás mértékének meghatározása céljából.

Gyakorlatilag a vizsgálatban a talaj nem azonosított fajtájú mikroba forrásként funkcionált. 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. 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.

## Eredmények

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

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 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. Ekkor a trágyamintákban mérhető doxiciklin koncentráció 9,37 mg/kg volt. Ezek alapján a doxiciklin felezési ideje a sertéstrágyában az állattartó telepen végrehajtott trágyaérleléses kísérletben 25,7 nap (3,68 hét) értéknek bizonyult. Az eredmények azt mutatják, 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.

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 hatóanyagtartalma 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. 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.

A nitrogén transzformációs vizsgálat során kapott eredmények azt mutatták, hogy a nitráttartalom hasonló volt a vizsgálat kezdetekor minden doxiciklinnel kezelt talajmintában és a kontrollban is (10 és 15 mg/kg talaj). A 7. napon jelentős nitrátkoncentráció-növekedés volt kimutatható minden egyes talajmintában, bár a nitráttartalom azokban a talajmintákban, amelyek a doxiciklint tartalmazták alacsonyabb volt, 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 (utolsó nap) 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, 25,3-36,8 mg/kg-os tartományban.

A redoxpotenciál-változásának mérése révén elsődlegesen azt tanulmányoztuk, hogy van-e hatása a doxiciklinnek a talajban lakó mikroorganizmusok anyagcsere-aktivitására. A doxiciklin valamennyi vizsgált talajtípusban befolyásolta a redox-potenciál változását. Ez a hatás a homoktalaj 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 volt kimutatható (53,5-84,9%-os TTD növekedés). Az eredményekből az is látható, hogy doxiciklin esetében már 200 µg/kg koncentrációnál tapasztalható a detektációs idő növekedése és a koncentráció emelkedésével ez a hatás egyre kifejezettebbé válik. Az enrofloxacin hatása a redoxpotenciál-változásra kevésbé kifejezett volt, sőt az iszapos vályogtalaj és a vályogtalaj esetében egyáltalán nem is volt kimutatható koncentrációfüggő hatás és az iszapos-agyagos

vályog esetében is meglehetősen korlátozottnak bizonyult. A homoktalajban és a vulkanikus hamu talajban 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. Linkomicin esetében is az tapasztalható, hogy az antibiotikum hatása a redoxpotenciál-változás mértékére a koncentráció függvényében talajtípusonként változó. A legkifejezettebb hatás a homoktalaj, az iszapos vályogtalaj és a vulkanikus hamu talaj 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.

## Következtetések

A telepen végzett trágyaérelés során a doxiciklin lebomlása gyorsabb volt, mint a laboratóriumi vizsgálatban. A lehetséges különbség egyrészt magyarázható a trágyahalomban a természetes fénynek kitett doxiciklin fotodegradációjával, amint annak lehetőségét egyéb antibiotikumok esetében más szerzők is leírták, bár ezt a talajban történő lebomlás vizsgálata során kapott eredmények nem támasztják alá. 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. 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) volt. Az irodalomban publikált eredmények tetraciklinre, klórtetraciklinre és oxitetraciklinre vonatkoznak, de alapvetően hasonló tartományba esnek, mint a saját kísérleteink esetében a doxiciklinnel kapott eredmények. 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.

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 0,004-0,9 mg/kg közötti értékben. A legtöbb adat azonban az eltérő körülmények miatt nem, vagy többnyire alig összevethető az általunk kapott eredményekkel. A mélyebb rétegekben kimutatható tetraciklinek mennyiségéről és lebomlásáról is csak korlátozottan állnak rendelkezésre irodalmi adatok. A szakirodalomban közölt eredmények szerint 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 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. 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 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. 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.

A doxiciklin potenciális hatását a talajban élő mikroorganizmusokra az úgynevezett nitrogén transzformációs teszt segítségével vizsgáltuk. Az eredmények azt mutatják, hogy az inkubáció hetedik napján a mérhető nitráttartalom jelentősen emelkedett. Ennek háttérében a lucernaliszt mint szerves tápanyagforrás hozzáadása állhat, amelyet a talajmintában élő mikroorganizmusok hasznosítottak. Az egy hetes inkubáció után mérhető nitrát koncentrációk különbsége a kezelt, illetve a kontroll mintákban szintén jelentős volt. A kezeletlen talajban mérhető értékekhez képest 32,9-60%-kal kevesebb nitrát képződött, aminek háttérében 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. A vizsgálat végén tapasztalható kiegyenlítődés magyarázható lehet azzal, hogy idővel a talaj mikrobiális populációja alkalmazkodott a doxiciklin jelenlétéhez. Ez jelentkezhethet, pl. a mikrobiális szerkezet vagy diverzitás változásában. Szakirodalmi adatok szerint az antibiotikumok egy állandó szelekciós nyomást jelenthetnek a mikrobákra és ez egy elmozdulást eredményezhet a baktériumok és gombák arányában ez utóbbiak javára. Más szerzők arra is rámutattak, hogy a antibiotikum hatására megváltozott mikrobiális sokszínűség visszatér az eredeti állapotba, viszont a közösségi szerkezetben bekövetkező változások tartósak bizonyultak. Összességében vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a doxiciklin a talajban lehetséges koncentrációkban átmenetileg számottevően gátolja a mikrobák nitrogén transzformációját, de a vizsgálat végén, a 28. napon a gátlás mértéke már nem éri el a vonatkozó szakmai irányelv által jelentősnek tekintett küszöbértéket.

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 a talajlakó mikroorganizmusokra kifejtett hatást. 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 és a vulkanikus hamu talajban 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 és az iszapos vályog 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 hamu és iszapos vályog 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-, iszapos-agyagos vályog- és vulkanikus hamu talajokban, míg iszapos vályog 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 mikroflóra anyagcsere-aktivitását jelző redoxpotenciál változását. 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, másrészt antibiotikum hatására a talaj mikrobiális szerkezetében és diverzitásában bekövetkező változásával. Bár a 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.

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

## 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. 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.

**Formázott:** Felsorolás és számozás

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 nitrogén transzformációját, 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.

## A témában megjelent tudományos publikációk

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

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

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\*)

*Egyéb közlemények:*

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\*)



*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