

## ZANIECZYSZCZENIE ŚRODOWISKA PRZYRODNICZEGO LEKAMI. I: OCENA TOKSYCZNOŚCI TRZECH FLUOROCHINOLONÓW DLA RZĘSY DROBNEJ *LEMNA MINOR*

Magdalena Bielińska, Grzegorz Nałęcz-Jawecki\*

Wydział Farmaceutyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny  
Zakład Badania Środowiska, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

\*Autor korespondujący: tel. +22 5720740, e-mail: [grzegorz.nalecz-jawecki@wum.edu.pl](mailto:grzegorz.nalecz-jawecki@wum.edu.pl)

Otrzymany 22.06.2009; zaakceptowany 24.08.2009; zamieszczony 17.09.2009

### STRESZCZENIE

Bardzo ważną grupą substancji o potencjalnie szkodliwym działaniu dla środowiska są leki stosowane w medycynie i weterynarii. Antybiotyki i chemioterapeutyki mogą wykazywać działanie toksyczne w bardzo niskich stężeniach. Dodatkowo, ciągła ekspozycja bakterii nawet na niskie stężenia związków bakteriostatycznych może prowadzić do powstawania opornych szczepów mikroorganizmów. Leki mogą mieć też wysoką aktywność biologiczną wobec roślin. Stężenie toksyczne, powodujące 20% spadek wzrostu ( $EC_{20}$ ) rzęsy drobnej (*Lemna minor*), w przypadku fluorochinolonów ciprofloksacyny, ofloksacyny i lomefloksacyny wynosi odpowiednio: 64, 100 oraz 370  $\mu\text{g/l}$ .

**SŁOWA KLUCZOWE:** fluorochinolony, ekotoksykologia, rzęsa drobna, leki w środowisku

### ABSTRACT

PHARMACEUTICALS IN THE ENVIRONMENT. I: EVALUATION OF TOXICITY OF THREE FLUOROQUINOLONES TO DUCKWEED *LEMNA MINOR*

Drugs used in human and veterinary medicine belong to a new class of environmental pollutants. Antibiotics and chemotherapeutics may produce biological effects at very low concentrations. Moreover, the continuous exposure of bacteria to even small concentrations of antibiotics or active metabolites could lead to the emergence of resistant bacteria strains. Antibiotics also may have high biological activity against non-target organisms as plants. In case of duckweed (*Lemna minor*) the  $EC_{20}$  values for fluoroquinolones as ciprofloxacin, ofloxacin and lomefloxacin are 64, 100 and 370  $\mu\text{g/l}$ , respectively.

**KEYWORDS:** fluoroquinolones, ecotoxicology, duckweed, drugs in the environment

### WSTĘP

#### Leki w środowisku

Bardzo ważną grupą substancji o potencjalnie szkodliwym dla środowiska działaniu są substancje lecznicze stosowane zarówno u ludzi jak i w weterynarii, środki diagnostyczne, odżywki oraz aktywne składniki produktów pielęgnacyjnych, takie jak substancje zapachowe czy substancje promieniochronne (filtry słoneczne). Środkom tym do połowy lat 90-tych poświęcano niewiele uwagi, a przecież są one stale dostarczane do zbiorników wodnych w postaci niezmienionej lub jako aktywne metabolity (Breton i Boxall, 2003, Daughton i Ternes, 1999, Fent i in., 2006). Ze względu na ich specyficzny sposób działania oraz fakt, że z założenia są tworzone z myślą, aby oddziaływać na organizmy ludzi, ssaków czy innych kręgowców, ich pozostałości w środowisku mogą być dla nas znacznie bardziej niebezpieczne niż pozostałości pestycydów, których głównym celem działania są chwasty, grzyby i bezkręgowce szkodniki (Clevers, 2002).

Głównym źródłem zanieczyszczenia lekami są ścieki komunalne i szpitalne, często zrzucane do rzek bez wcześniejszego oczyszczania. Zawarte w nich substancje, mimo że obecne w niewielkich stężeniach rzędu ng -  $\mu\text{g/l}$ , utrzymują się trwale w środowisku wodnym ze względu na ich ciągłe dostarczanie, działając na wiele pokoleń organizmów wodnych. W wodach powierzchniowych często można wykryć wiele substancji leczniczych, w tym leków przeciwbólowych i przeciwzapalnych, regulujących poziom lipidów,  $\beta$ -blokerów,  $\beta$ -sympatykomimetyków, antybiotyków, hormonów oraz leków przeciwpadaczkowych.

Szczególny problem stanowi obecność antybiotyków w środowisku, które nie tylko stosowane są w leczeniu infekcji u ludzi, ale używane są także na farmach trzody chlewnej w celach profilaktycznych lub jako promotory wzrostu (Kümmerer, 2001). W tym celu dodawane są one do paszy, a następnie wydalone przez zwierzęta z kałem. Tak powstała gnojówka jest często stosowana na polach uprawnych jako nawóz, a zawarte w niej antybiotyki przedostają się do gleby i wód gruntowych. Weterynaryjne promotory wzrostu, takie jak spiromycyna czy wirginiamy-

cyna nie są stosowane w leczeniu ludzi, ale prawdopodobnie mogą wywoływać oporność bakterii na inne antybiotyki, także te używane przez ludzi. Antybiotyki są także powszechnie stosowane w hodowlach ryb. Do najczęściej podawanych należą tetracykliny, sulfonamidy i chloramfenikol. Są one dodawane do paszy lub bezpośrednio rozpuszczane w wodzie. Te, które nie zostaną zużyte odkładają się w osadach dennych gdzie albo ulegają degradacji, lub są wypłukiwane do otaczających zbiorników wodnych.

Po dostaniu się do organizmu jedynie część leków opuszcza go w formie niezmienionej, większość natomiast uczestniczy w procesach I i II fazy metabolizmu. Powstałe w ten sposób metabolity są wydalone wraz z moczem lub kałem i ze ściekami dostają się do zbiorników wodnych. Badania wykazały, że substancje te mogą ulegać w środowisku przekształceniu do związków macierzystych, wykazujących wyjściową aktywność. Istnieje możliwość, że leki, które w organizmie człowieka zostały przekształcone w nieaktywne metabolity mogą w środowisku odzyskiwać swoje biologiczne działanie poprzez rozrywanie wiązania z kwasem glukuronowym. Przykładem mogą być glukuronid chloramfenikolu, dwa glukuronidy 17- $\beta$ -estradiolu oraz N-4-acetylowana sulfametazyna, które w środowisku wodnym ulegają przekształceniu do związków macierzystych (Hirsch i in., 1999).

Kolejny problem ze stosowaniem antybiotyków związany jest z tym, że nawet w oczyszczalniach ścieków nie są one całkowicie usuwane. Szacunkowe dane wskazują, że ilość usuwanych antybiotyków ze ścieków komunalnych i szpitalnych waha się między 60 a 90%. Stężenie tetracyklin, których eliminacja podczas procesów oczyszczania wynosi 95%, w oczyszczonych ściekach wynosiło 13  $\mu\text{g/l}$ .

Stała obecność antybiotyków w środowisku przyczynia się do selekcjonowania opornych szczepów bakterii, co może stać się już niedługo poważnym problemem, gdyż wielu infekcji nie da się leczyć dostępnymi antybiotykami. Już teraz około 70% bakterii jest niewrażliwych na co najmniej jeden antybiotyk, a liczne wykazują oporność wielolekową. Wśród drobnoustrojów najczęściej spotyka się oporność na penicylinę, bacytracynę, tetracykliny czy erytromycynę, a niewrażliwe szczepy bakterii izoluje się z próbek wody pochodzącej z rzek, jezior i wód gruntowych (Hirsch i in., 1999). Ze ścieków szpitalnych izolowano szczepy *E. coli* całkowicie niewrażliwe na fluorochinolony oraz szczepy *Klebsiellae* niewrażliwe na ampicilinę lub wykazujące oporność wielolekową. Spotykano także drobnoustroje odporne na bacytracynę, tetracykliny czy erytromycynę. Często geny odpowiedzialne za wytwarzanie oporności zlokalizowane są na tzw. plazmidach R, które mogą być przekazywane innym bakteriom, co znacznie przyspiesza szerzenie się oporności (Hirsch i in., 1999).

### Fluorochinolony w środowisku

Od zsyntetyzowania kwasu nalidyksowego w 1962 roku, chinolony przeszły długą drogę ewolucji, w czasie której wielokrotnie modyfikowano strukturę cząsteczek, poprawiając ich skuteczność i farmakokinetykę. Początkowo była to tylko mała grupa leków o wąskim zakresie działania, ograniczonym właściwie do bakterii Gram ujemnych i niewielkiej liczbie wskazań do stosowania. Dzisiaj natomiast leki z tej grupy należą do jednych z najczęściej podawanych doustnie (a w niektórych przypadkach także

dożylnie) antybiotyków, skutecznych także w walce z bakteriami Gram dodatnimi i beztlenowcami, stosowanych w medycynie i weterynarii. Przy dużej skuteczności pozostają dobrze tolerowane przez organizm ludzki, a wywoływane przez nie działania niepożądane są nieliczne i zazwyczaj nie stanowią zagrożenia dla zdrowia lub życia (Ball, 2000).

Tak duże rozpowszechnienie fluorochinolonów w lecznictwie niesie ze sobą ryzyko środowiskowe. Wraz ze ściekami pochodzącymi ze szpitali oraz ściekami komunalnymi te leki i ich metabolity dostają się do zbiorników wodnych (Fent i in., 2006, Golet i in., 2003). Coraz częściej praktykuje się także nawożenie pól uprawnych gnojówką pochodzącą z ferm trzody chlewnej, która jest bogatym źródłem m.in. fluorochinolonów. Tą drogą związki te przedostają się do gleby, gdzie mogą się kumulować i wywoływać wiele szkodliwych działań na organizmy zamieszkujące to środowisko (Picó i Andreu, 2007). Badania dowiodły, że w tak nawożonych glebach przez długi czas pozostają śladowe ilości antybiotyków, które mogą przemieszczać się także do wód podziemnych oraz wraz ze splotem powierzchniowym - do rzek i jezior.

Ścieki szpitalne najczęściej trafiają do kanalizacji miejskiej i są oczyszczane w komunalnych oczyszczalniach ścieków. W Hanoi przebadano ścieki pochodzące z sześciu największych szpitali w tym regionie pod kątem obecności w nich najczęściej stosowanych fluorochinolonów: ciprofloksacyny, norfloksacyny, lewofloksacyny, ofloksacyny i lomefloksacyny. Spośród sześciu przebadanych placówek tylko w jednej z nich oczyszczano ścieki przed usunięciem ich ze szpitala (Duong i in., 2008). Badania wykazały, że w ściekach nieoczyszczonych spośród pięciu poszukiwanych leków obecne były jedynie ciprofloksacyna i norfloksacyna. Pozostałe, mimo że stosowane w dużych ilościach, nie zostały wykryte. Stężenia ciprofloksacyny wahały się w granicach od 1,1 do 44  $\mu\text{g/l}$ , a norfloksacyny od 0,9 do 17  $\mu\text{g/l}$ . Wartości te są porównywalne z wynikami badań przeprowadzonych w Szwajcarii, Szwecji i Niemczech. Najwyższe stężenia fluorochinolonów wykryto w ściekach pochodzących ze szpitali z dużymi oddziałami chirurgicznymi. Ustalono, że w takich szpitalach przybliżone dzienne zużycie norfloksacyny i ciprofloksacyny na pacjenta dzień nie może wynosić od 7,5 do 34,3 mg.

Klasyczne metody oczyszczania ścieków komunalnych są w różnym stopniu skuteczne w przypadku leków. W Hanoi w wyniku mechanicznego i biologicznego oczyszczania ilości ciprofloksacyny w ściekach szpitalnych ulegały zmniejszeniu średnio o 86%, a norfloksacyny o 82%.

Fluorochinolony, które dostaną się do zbiorników wodnych są jedynie w niewielkim stopniu rozkładane przez żyjące tam mikroorganizmy i potrafią przez długi czas utrzymywać się w wodach powierzchniowych oddziałując na organizmy wodne. Główne niebezpieczeństwo takiej sytuacji polega na tym, iż mimo, że związki te obecne są w wodach w ilościach śladowych, rzędu ng/l, to jednak działają w sposób długotrwały ze względu na ich ciągłe dostarczanie ze ściekami (związki pseudopersystentne). Wywoływane w ten sposób subtelne, często niezauważalne zmiany u ważnych z ekologicznego punktu widzenia organizmów utrwalają się przez wiele pokoleń. Może to w końcu doprowadzić do powstania trwałych i nieodwracalnych zmian, które przekroczą zdolności adaptacyjne wielu gatunków zamieszkujących strumienie, rzeki i jeziora.

### Fitotoksykacja. Zastosowanie roślin wodnych w testach oceny toksyczności

Rośliny wodne są reprezentowane przez dużą różnorodność gatunków glonów i roślin wyższych zamieszkujących różne siedliska. Od dawna wykorzystuje się je w badaniach jakości wody, szacowania toksyczności ścieków komunalnych i przemysłowych oraz rejestracji handlowych substancji chemicznych. Umożliwiają ocenę nie tylko toksyczności, ale także potencjalnych właściwości biogen-nych badanych próbek. Mimo to, wyłączając rejestrację pestycydów, dane otrzymane w badaniach fitotoksyczności rzadko bierze się pod uwagę przy ustalaniu regulacji prawnych związanych ze szkodliwym działaniem na środowisko potencjalnych zanieczyszczeń. Dużo większe znaczenie posiadają testy toksyczności ostrej prowadzone na różnych gatunkach zwierząt. Spośród 20 najczęściej stosowanych organizmów testowych zarejestrowanych w bazie danych AQUIRES, pierwszy gatunek roślinny, słodkowodny glon *Selenastrum capricornutum* zajmuje dopiero 13 pozycję (Mohan i Hosetti, 1999).

Słodkowodne gatunki glonów należą do najczęściej stosowanych organizmów służących do oceny fitotoksyczności. W wielu przypadkach używa się ich jako odpowiedników roślin wyższych. Wybór gatunków glonów używanych do badań jest najczęściej uzależniony od dostępności, wymagań życiowych oraz łatwości wykorzystania danego organizmu. Mając na uwadze te kryteria wyznaczono kilka standardowych organizmów testowych. Należą do nich zielenice: *Selenastrum capricornutum*, *Pseudokirchneriella subscapitata*, *Chlorella vulgaris* (ISO 8692, OECD 201) oraz sinice - *Anabaena flos-aque* i *Microcystis aeruginosa*. W standardowych testach glony ekspozowane są na działanie 5 stężeń analizowanych substancji najczęściej przez okres 3 - 4 dni. Przyrost biomasy oceniany jest zazwyczaj poprzez wyznaczenie stężenia komórek bądź przez spektrofotometryczny pomiar mętności badanej próbki. Rzadziej analizowany jest poziom chlorofilu lub intensywność fotosyntezy.

Gatunki należące do grupy roślin naczyniowych są wykorzystywane znacznie rzadziej niż glony. Z danych literaturowych wynika, że jedynie w przypadku 7% spośród 528 przeprowadzonych testów fitotoksyczności wykorzystywano rośliny wyższe. Ostatnio coraz więcej uwagi poświęca się wykorzystaniu w badaniach fitotoksyczności roślin z rodziny *Lemnaceae*, które podzielone są na cztery rodzaje: *Spirodela*, *Wolffiella*, *Lemna* i *Wolffia*.

#### Test *Lemna*

Rzęsa (*Lemna* spp.) jest rośliną słodkowodną szeroko rozpowszechnioną na świecie. Znanych jest około 40 gatunków występujących zarówno w tropikach jak i w umiarkowanych strefach klimatycznych. Należy do organizmów łatwo przystosowujących się do zmieniających się warunków środowiska. Z drugiej jednak strony jest wrażliwa na zanieczyszczenia substancjami toksycznymi. Jako że jest rośliną unoszącą się na powierzchni zbiorników wodnych, najbardziej narażona jest na substancje powierzchniowo czynne, hydrofobowe, koncentrujące się na powierzchni wody. Wybór gatunków do testów zależy zazwyczaj od dostępności organizmu i jego wrażliwości na substancje toksyczne. Najczęściej rekomendowane są dwa gatunki:

rzęsa garbata (*L. gibba*) oraz rzęsa drobna (*L. minor*) (ISO 20079, OECD 221). Cechami, które sprawiają, że są one organizmami bardzo wygodnymi w badaniach laboratoryjnych są ich małe rozmiary, prosta budowa, wegetatywny sposób rozmnażania i krótki czas między kolejnymi podziałami.



Ryc. 1. Rzęsa drobna *Lemna minor* (fot. autor).

Rzęsa drobna jest byliną uważaną za jedną z najmniejszych roślin naczyniowych na świecie. Szerokość całej rośliny waha się od 2 do 7 mm. Należy do gatunków kosmopolitycznych, można spotkać ją na wszystkich kontynentach z wyjątkiem Antarktydy. Zamieszkuje przeważnie wody stojące lub wolno płynące, najczęściej starorzecza, stawy, sadzawki i doły potorfowe. W okresie letnim gęstym kożuchem pokrywa powierzchnię zbiorników wodnych, zaś jesienią wytwarza liście zawierające dużo większe ilości skrobi i opada na dno. Ciało tej rośliny w drodze ewolucji uległo silnemu uproszczeniu, nie posiada ono tkanek przewodzących ani nie wykazuje zróżnicowania na organy. Małe, okrągłe i spłaszczone człony pędowe (frondy) są skórzaste i kształtem przypominają liście. Rzęsa posiada pojedynczy korzeń i rzadko wytwarza kwiaty, które nie mają okwiatu i są jednopłciowe. *L. minor* rozmnaża się przede wszystkim wegetatywnie, tworząc pączki u nasady pędów, a następnie odłączając tak powstały człon, który daje początek nowej roślinie.

Dla badań z udziałem rzęsy opracowano normy ISO i OECD zawierające dokładne wytyczne i standardy 7-dniowego testu oceniającego zahamowanie wzrostu organizmu testowego. Podczas gdy wskazówki zawarte w zaleceniach OECD zostały stworzone z myślą o różnych substancjach chemicznych, normy ISO odnoszą się przede wszystkim do próbek środowiskowych. Punktami końcowymi testów oceny toksyczności mogą być: liczba roślin, liczba i powierzchnia frondów, liczba i długość korzeni, sucha lub świeża biomasa oraz zawartość chlorofilu. Zazwyczaj w testach fitotoksyczności ocenia się liczbę frondów, ze względu na to, że jest to metoda prosta, szybka i nie powoduje zniszczenia organizmu testowego.

#### BADANIA WŁASNE

Celem badań przeprowadzonych w naszej placówce była ocena fitotoksyczności trzech antybiotyków z grupy fluorochinolonów: ciprofloksacyny, lomefloksacyny i ofloksacyny przy użyciu mikropłytkowego testu wykorzystującego rzęsę drobną *Lemna minor*.

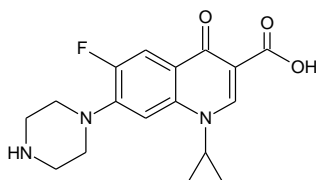
## MATERIAŁY I METODY

### Badane związki

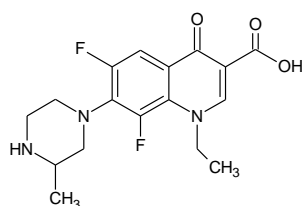
Ciprofloksacyna - Fluka, CAS [85721-33-1]

Lomefloksacyny chlorowodorek - Sigma, CAS [98079-52-8]

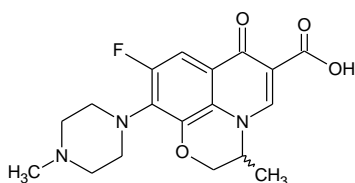
Ofloksacyna - Sigma, CAS [82419-36-1]



Ciprofloksacyna



Lomefloksacyna



Ofloksacyna

Ryc. 2. Wzory strukturalne badanych fluorochinolonów.

### Wykonanie testu Lemna

W badaniach zastosowano pożywkę wzrostową Steinberg'a (OECD 221), służącą zarówno jako płyn do sporządzania rozcieńczeń badanych leków, jak i płyn w próbkach kontrolnych. Każdy lek badano w pięciu stężeniach (2-krotny szereg rozcieńczeń). Test prowadzono w jednorazowych, polistyrenowych mikroplastykach (6 celek) z pokrywką. Do pięciu celek mikroplastyki dodawano po 10 ml każdego roztworu z rozcieńczeń, do szóstej celki - 10 ml pożywki. Dla każdej serii badawczej nastawiano jedną, niezależną płytkę zawierającą tylko pożywkę (płytkę kontrolną). Następnie w każdej celce mikroplastyki umieszczano pojedynczą roślinę, składającą się z 3 - 4 frondów. Warunki prowadzenia testu zostały dobrane tak, aby zapewniały logarytmiczny wzrost rzęsy, a liczba frondów ulegała siedmiokrotnemu zwiększeniu (współczynnik wzrostu większy od 0,275). Stałe warunki oświetlenia o natężeniu 2600-3000 lx uzyskano dzięki zastosowaniu lampy o szerokim spektrum promieniowania widzialnego. Odchylenia od ustalonego natężenia mierzone w minimum pięciu punktach oświetlanej powierzchni nie przekraczały 15%. Hodowla została zabezpieczona przed dostępem światła bocznego i od spodu naczynia. Temperatura w pomieszczeniu, w którym prowadzona była hodowla testowa wynosiła  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Ocenę liczby frondów prowadzono w dniu nastawiania testu oraz po 6-dniowej inkubacji. W celu zwiększenia dokładności pomiaru, w dniu odczytywania testu, płytki

skanowano za pomocą skanera płaskiego hp Scanjet 7400c (układ do skanowania negatywów), a frondy zliczano przy pomocy programu komputerowego Image Tool. Jednocześnie wizualnie oceniano występowanie zmian chlorotycznych i nekrotycznych.

### Obliczenia

Współczynnik wzrostu liczono dla każdego powtórzenia próbki testowej i kontrolnej według poniższego wzoru:

$$R = \frac{\ln x_{t_2} - \ln x_{t_1}}{t_2 - t_1}$$

gdzie:

R - współczynnik wzrostu

$x_{t_1}$  - wartość reakcji testowej w czasie  $t_1$  (w dniu nastawienia testu)

$x_{t_2}$  - wartość reakcji testowej w czasie  $t_2$  (w dniu zakończenia testu)

$t_2 - t_1$  - różnica między  $x_{t_2}$  a  $x_{t_1}$  - czas trwania testu (6 dni).

Współczynnik zahamowania wzrostu liczono dla każdego powtórzenia próbki testowej zgodnie z podanym niżej wzorem:

$$IR = \frac{R_c - R_t}{R_c} \cdot 100\%$$

gdzie:

IR - współczynnik zahamowania wzrostu

$R_c$ ,  $R_t$  - współczynnik wzrostu w próbce kontrolnej (c) i testowej (t).

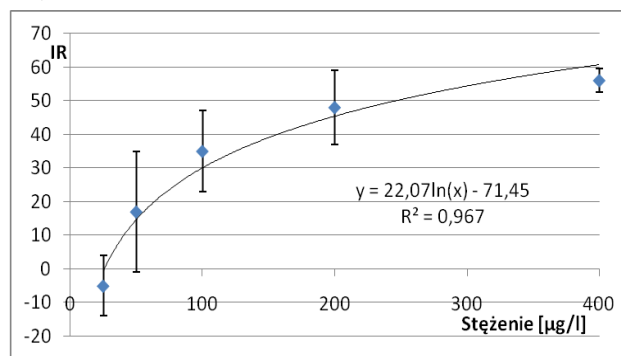
Na podstawie wartości współczynnika zahamowania wzrostu wyznaczono wartości  $EC_{50}$ ,  $EC_{20}$  i  $EC_{10}$ , czyli stężenia substancji hamujące wzrost rzęsy o odpowiednio 50, 20 i 10 procent.

### WYNIKI I DYSKUSJA

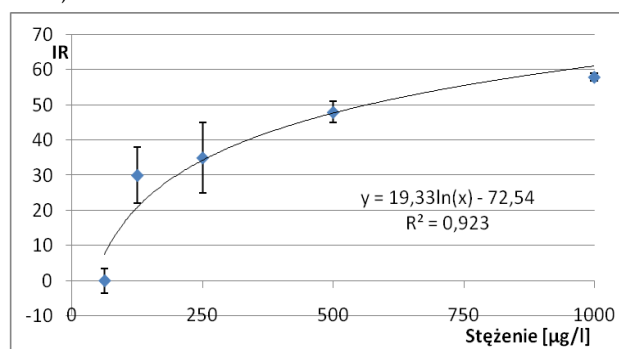
Wartości  $EC_{50}$ ,  $EC_{20}$  i  $EC_{10}$  zamieszczono w Tabeli 1. Dziesięcioprocentowy efekt testowy (w tym przypadku zahamowanie wzrostu rzęsy) uznawany jest jako wartość progowa, powyżej której badana próbka jest toksyczna dla organizmu testowego. Natomiast  $EC_{50}$  jest parametrem służącym do porównywania stopnia toksyczności substancji chemicznych i próbek środowiskowych. Spośród badanych fluorochinolonów najwyższą toksycznością charakteryzowała się ciprofloksacyna, dwukrotnie mniej toksyczna była ofloksacyna, a najmniej toksyczna - lomefloksacyna. Dla wszystkich trzech leków odnotowano wysoką zależność współczynnika zahamowania wzrostu od logarytmu stężenia (Ryc. 3) - wartość  $R^2$  wyniosła od 0,923 do 0,967.

Dane uzyskane w niniejszych badaniach dla testu mikroplastykowego porównano z wynikami analiz przeprowadzonych na rzęsie drobnej przez Robinson i in. (2005) oraz rzęsie garbatej przez Brain i in. (2004) (Tabela 2). W pracach tych toksyczność antybiotyków analizowano w klasycznym 7-dniowym teście w zlewkach w warunkach semistatycznych t.j. codziennej wymiany roztworów testowych na świeże w celu utrzymania stałego stężenia badanych związków.

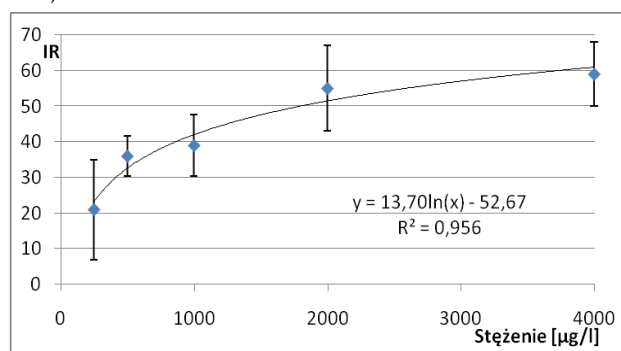
CIP)



FLOO)



LOM)



Ryc. 3. Zależność współczynnika zahamowania wzrostu (IR) od stężenia. CIP) ciprofloksacyna, FLOO) ofloksacyna, LOM) lomefloksacyna.

Jedynie wartość  $EC_{50}$  ciprofloksacyny podana przez Robinson i in. (2005) była zbliżona do naszych wyników. Dane dotyczące ofloksacyny, a zwłaszcza lomefloksacyny były 4 i ponad 20-krotnie niższe. Tak duża różnica wynika z trwałości roztworów wodnych badanych antybiotyków. Analizy chemiczne wykazały, że już po 24 godzinach stężenie lomefloksacyny w roztworze spadało do 30%, podczas gdy poziom pozostałych antybiotyków prawie się nie zmienił (Robinson i in., 2005). Uzyskane dane wskazują na

konieczność wymiany badanych roztworów w czasie prowadzenia badań chronicznych, a także monitorowania poziomów analizowanych substancji toksycznych.

Rzęsa garbata (*L. gibba*) w badaniach Brain i in. (2004) reagowała na obecność ofloksacyny przy stężeniach podobnych jak rzęsa drobna. Jednakże wobec ciprofloksacyny była 3-krotnie mniej wrażliwa, natomiast w stosunku do lomefloksacyny jej wrażliwość była podobna do *L. minor* z badań Robinson i in. (2005).

Analizując uzyskane wyniki należy zwrócić uwagę na zależność współczynnika zahamowania wzrostu (IR) od stężenia próbki. Na Ryc. 3 wyraźnie widać, iż wraz ze wzrostem stężenia toksyczność lomefloksacyny wzrasta znacznie wolniej niż pozostałych związków. Świadczy o tym zarówno niska wartość współczynnika kierunkowego funkcji (13,7), jak i wysoka wartość stosunku  $EC_{50}/EC_{10} = 8,4$ . Podobne zależności można zauważyć rozpatrując toksyczność lomefloksacyny dla *L. gibba* (Tabela 2). W związku z tym niewielkie zmiany w czasie prowadzenia testu np. różnice wzrostu kontroli mogą skutkować dużymi zmianami wartości  $EC_{50}$ .

Zmiany chlorotyczne u rzęsy drobnej pojawiały się w wyniku ekspozycji na wszystkie badane związki już od stężeń 50-150 µg/l. Obserwowane odbarwienia dotyczyły przede wszystkim młodych frondów (Ryc. 4 i 5). Przy rejestracji wyników (obliczaniu wartości EC) frondy te uznawane były za prawidłowe, mimo że nie stanowiły pełnowartościowych części roślin. Stąd wartości EC mogą być zawyżone. W dalszych badaniach planowana jest ocena toksyczności na podstawie pomiaru powierzchni rzęsy, z uwzględnieniem powierzchni zmian chlorotycznych. Podejście to będzie wymagało zastosowania wstępnej obróbki zdjęć np. zwiększenia kontrastu i nasycenia barwy czerwonej (Ryc. 5).

Zmiany chlorotyczne (zanik chloroplastów u rzęs pod wpływem antybiotyków fluorochinolonowych) były szeroko dyskutowane w poprzednich pracach (Brain i in., 2004, Robinson i in., 2005). Według jednej z teorii tak duży stopień wrażliwości tej rośliny, porównywalny z cyjanobakteriami, wynika z faktu, iż chloroplasty są organellami pochodzenia prokariotycznego i posiadają podobne szlaki metaboliczne jak mikroorganizmy. Działanie bakteriobójcze chinolonów związane jest z hamowaniem dwóch enzymów bakteryjnych: gyrazy DNA i topoizomerazy IV. Pierwszy z nich odpowiada za powstawanie ujemnego superhelikalnego skrętu w nici DNA. Proces ten jest niezbędny podczas replikacji i transkrypcji. Topoizomeraza IV z kolei jest analogiem gyrazy, a jej rola w komórce związana jest z umożliwianiem rozdzielania chromosomów i ich przejścia do komórki potomnej.

Tabela 1. Toksyczność fluorochinolonów dla rzęsy drobnej.

Lek	$EC_{10}^*$	$EC_{20}^*$	$EC_{50}^*$
Ciprofloksacyna	47 ± 15	64 ± 24	243 ± 119
Ofloksacyna	77 ± 2	100 ± 11	585 ± 177
Lomefloksacyna	280 ± 1	370 ± 1	2350 ± 1440

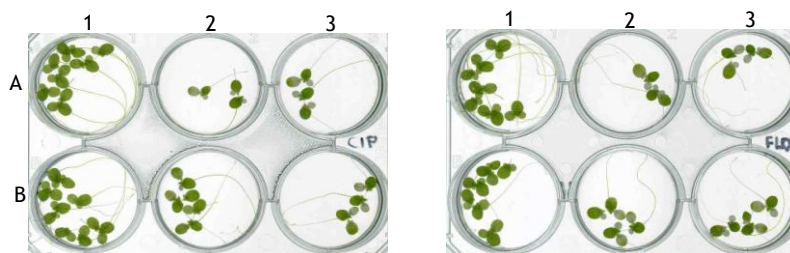
\* Średnia z 3 wyników ± odchylenie standardowe. Wartości stężeń w µg/l.



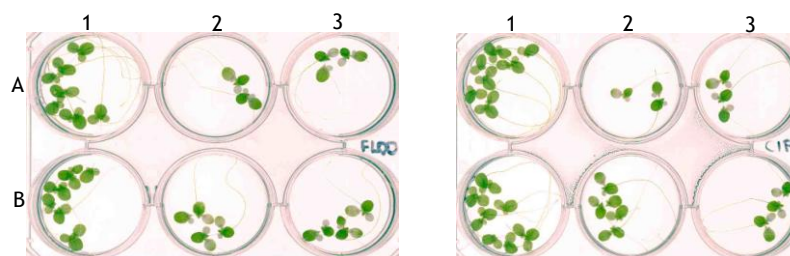
Tabela 2. Toksyczność fluorochinolonów dla rzęsy drobnej - *L. minor* (Robinson i in., 2005) i garbatej - *L. gibba* (Brain i in., 2004).

Lek	Brain i in.(2004)			Robinson i in.(2005)
	EC <sub>10</sub> *	EC <sub>25</sub> *	EC <sub>50</sub> *	EC <sub>50</sub> *
Ciprofloksacyna	106 (39-172)	271 (171-372)	697 (554-861)	203 (41-364)
Ofloksacyna	121 (1-243)	281 (110-452)	653 (399-906)	126 (52-201)
Lomefloksacyna	8 (1 - 16)	30 (10 - 50)	116 (66-165)	106 (45-167)

\* Średnia (95% przedział ufności). Wartości stężeń w µg/l.



Ryc. 4. Obraz płytki testowej dla ciprofloksacyny (CIP) i ofloksacyny (FLOO).



Ryc. 5. Zwiększenie kontrastu dla koloru czerwonego uwypatnia efekt chlorozy dla ciprofloksacyny (CIP) i ofloksacyny (FLOO).

**Legenda do Ryc. 4 i 5:** 6-dółkowa płytka testowa zawiera próbkę kontrolną (w celce A1 - lewy, górny róg) oraz 5 stężeń badanej próbki: w kolejności od najwyższego do najniższego: A2, A3, B3, B2 i B1. Na początku testu w każdej celce umieszczono 1 roślinę składającą się z 3 frondów. Zdjęcia przedstawiają obraz płytek po 6 dniach inkubacji.

## WYKAZ SKRÓTÓW

- R - współczynnik wzrostu rzęsy  
 IR - współczynnik zahamowania wzrostu rzęsy pod wpływem badanej próbki  
 EC<sub>50</sub>, EC<sub>20</sub> i EC<sub>10</sub> - stężenia substancji hamujące wzrost organizmu testowego o odpowiednio 50, 20 i 10 procent  
 CIP - ciprofloksacyna  
 FLOO - ofloksacyna  
 LOM - lomefloksacyna

## BIBLIOGRAFIA

- Ball P. (2000). Quinolone generations: natural history or natural selection? *J Antimicrob Chemotherapy* 46: 17-24.
- Brain R.A., Johnson D.J., Richards S.M., Sanderson H., Sibley P.K., Solomon K.R. (2004). Effects of 25 pharmaceutical compounds to *Lemna gibba* using a seven-day static-renewal test. *Environ Toxicol Chem.* 23: 371-382.
- Breton R., Boxall A. (2003). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Regulatory drivers and research needs. *QSAR & Combinatorial Sci.* 22: 399-409.
- Cleuvers M. (2003). Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol Lett.* 142: 185-194.
- Daughton C.G., Ternes T.A. (1999). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ Health Perspect.* 107: 907-938.
- Duong H.A., Pham N.H., Nguyen H.T., Hoang T.T., Pham H.V., Pham V.C., Berg M., Giger W., Alder A.C. (2008). Occurrence, fate and antibiotic resistance of fluoroquinolone antibacterials in hospital wastewaters in Hanoi, Vietnam. *Chemosphere* 72: 968-973.
- Fent K., Weston A.A., Caminada D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat Toxicol.* 76: 122-159.
- Golet E.M., Xifra I., Siegrist H., Alder A.C., Giger W. (2003). Environmental exposure assessment of fluoroquinolone antibacterial agents from sewage to soil. *Environ Sci Technol.* 37: 3243-3249.
- Hirsch R., Ternes T., Haberer K., Kratz K.-L. (1999). Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Sci Total Environ.* 225: 109-118.
- ISO 8692. (1993). Water Quality - Algal Growth Inhibition Test. International Organisation for Standardisation.
- ISO DIS 20079. Water Quality - Determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water to Duckweed (*Lemna minor*) - Duckweed Growth Inhibition Test. International Organisation for Standardisation.
- Kümmerer K. (2001). Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources - a review. *Chemosphere* 45: 957-969.
- Mohan B.S., Hosetti B.B. (1999). Aquatic Plants for Toxicity Assessment. *Environ Res Section A.* 81: 259-274.
- OECD 201. (2006). Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. Guideline for the testing of chemicals. OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

15. OECD 221. (2006). *Lemna* sp. Growth Inhibition Test. Guideline for the testing of chemicals. OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
16. Picó Y., Andreu V. (2007). Fluoroquinolones in soil: risks and challenges. *Anal Bioanal Chem.* 387: 1287-1299.
17. Robinson A.A., Belden J.B., Lydy M.J. (2005). Toxicity of fluoroquinolone antibiotics to aquatic organisms. *Environ Toxicol Chem.* 24: 423-430.