

Ewa ADAMEK^{1*}, Wojciech BARAN¹ i Roman ADAMCZYK¹

AEROBOWA DEGRADACJA AMPICYLINY W GLEBIE

AEROBIC DEGRADATION OF AMPICILLIN IN SOIL

Abstrakt: Ampicylina jest antybiotykiem należącym do grupy β -laktamów. Jest ona powszechnie stosowana w weterynarii, a wraz z odchodami zwierząt hodowlanych jest wprowadzana do gleby. Może to mieć negatywne skutki dla bytujących tam mikroorganizmów i sprzyjać rozwojowi lekooporności. Celem pracy było wyznaczenie kinetyki rozkładu ampicyliny inicjowanej przez mikroorganizmy glebowe w warunkach aerobowych. Ponadto dokonano identyfikacji produktów tego procesu za pomocą techniki UPLC-QTOF oraz określono ich wypadkowy wpływ na mikroorganizmy pochodzące ze środowiska wodnego wykorzystywane w teście MARA[®]. Stwierdzono, że mikroorganizmy pochodzące z gleby powodują rozkład ampicyliny. Proces ten przebiega przede wszystkim poprzez eliminację podstawników, a następnie otwarcie pierścienia laktamowego. Efektem jest obniżenie wypadkowej toksyczności chronicznej roztworów zawierających ampicylinę względem mikroorganizmów testowych.

Słowa kluczowe: antybiotyki, biodegradacja, mechanizm, toksyczność chroniczna

Wprowadzenie

Cechą charakterystyczną antybiotyków zaliczanych do penicylin, cefalosporyn, karbapenemów oraz monobaktamów jest posiadanie pierścienia β -laktamowego. Mechanizm działania tych leków polega na hamowaniu syntezy ściany komórkowej bakterii. Prowadzi to do zwiększenia jej przepuszczalności, a następnie do śmierci komórki bakteryjnej. Antybiotyki tej grupy charakteryzuje szerokie spektrum działania. Są skuteczne przeciwko drobnoustrojom Gram-dodatnim, Gram-ujemnym, tlenowym i beztlenowym. Ponadto, niektóre z wymienionych antybiotyków, w szczególności penicyliny, są stosunkowo tanie. Z tych powodów są szeroko stosowane w medycynie oraz - w znacznie większych ilościach - w weterynarii [1]. Według raportu Europejskiej Komisji Leków, Polska znajduje się w pierwszej ósemce państw europejskich pod względem ilości antybiotyków weterynaryjnych stosowanych u zwierząt hodowlanych [2, 3]. Antybiotyki β -laktamowe są jedną z głównych grup leków wykorzystywanych w tym dziale gospodarki [1, 4]. Niepokojące jest, że w Polsce konsumpcja tych związków nadal rośnie [3]. Konsekwencją takiego stanu rzeczy jest występowanie antybiotyków w produktach pochodzenia odzwierzęcego oraz wprowadzanie znacznych ilości tych leków do środowiska wraz z odchodami zwierząt [1, 3, 5, 6]. Również powszechne do niedawna i uważane za „proekologiczne” stosowanie w produkcji roślinnej nawozów naturalnych prowadzi do drastycznego zwiększenia różnorodności mikroorganizmów lekoopornych w nawożonej glebie [7]. Ponieważ możliwy jest horyzontalny transfer genów, istnieje realne ryzyko przeniesienia tej oporności na mikroorganizmy chorobotwórcze [6, 8]. Prawdopodobieństwo takiego scenariusza potwierdza obserwowany lawinowy wzrost ilości zidentyfikowanych u zwierząt i ludzi patogenów opornych na antybiotyki β -laktamowe.

¹ Zakład Chemii Ogólnej i Nieorganicznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec, tel. 32 364 15 62

*Autor do korespondencji: eadamek@sum.edu.pl

Praca była prezentowana podczas konferencji ECOpole' 19, Polanica-Zdrój, 9-12.10.2019

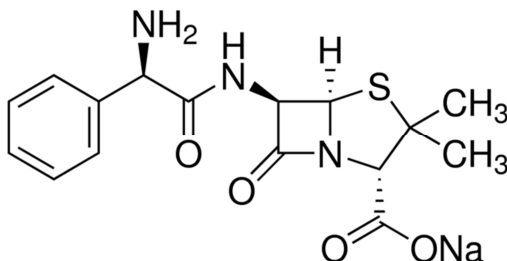
W Danii od początku XXI wieku ilość nowych metycylinoopornych przypadków zakażeń *Staphylococcus aureus* wzrosła ponad 43-krotnie [1]. Jeden z mechanizmów oporności tych antybiotyków polega na wytwarzaniu przez bakterię enzymów β -laktamaz. Enzymy te powodują otwarcie pierścienia laktamowego i dezaktywację leku. Niepokojące jest, że chronione w ten sposób są również inne, potencjalnie wrażliwe bakterie występujące w tym samym biotopie [9].

Negatywne skutki wywołane przez antybiotyki wprowadzane do środowiska zależą przede wszystkim od ich stężenia oraz od czasu, w jakim leki te oddziałują na biocenozę. Czas ten z kolei jest zależny od podatności poszczególnych leków na przemiany w środowisku generowane przez czynniki biotyczne i abiotyczne [5, 6, 8].

Celem badań było wyznaczenie kinetyki inicjowanej przez mikroorganizmy glebowe w warunkach aerobowej biodegradacji ampicyliny, antybiotyku należącego do grupy penicylin. Ponadto zamierzano również zidentyfikować produkty powstałe w tym procesie za pomocą techniki UPLC-QTOF oraz określić ich wypadkową toksyczność względem nieselekcjonowanych mikroorganizmów pochodzących ze środowiska wodnego.

Materiały i metody

Do badań wybrano półsyntetyczny antybiotyk z grupy penicylin, sól sodową ampicyliny (Sigma-Aldrich; czystość 91,0-100,5 %; rys. 1).



Rys. 1. Struktura ampicyliny

Fig. 1. Ampicillin structure

W badaniach wykorzystano próbki wierzchniej warstwy gleby pochodzące z parku miejskiego (Dąbrowa Górnicza - Zielone) oraz z pola uprawnego nawożonego nawozem kurzym (okolice Pszczyzny). Próbki gleby zostały pobrane zgodnie z normą PN-ISO 10381-2 [10]. Jako inokulum stosowano wodę z silnie zanieczyszczonej rzeki (Brynicy) oraz efluent z oczyszczalni ścieków (Sosnowiec - Zagórze). Wartości mikrobiologicznego stężenia toksycznego (*MTC*) wyznaczone dla tego antybiotyku względem mikroorganizmów inokulum wynosiło od 7,3 do 9,9 mg/dm³.

Bezpośrednio przed rozpoczęciem eksperymentu próbki gleby o objętości 1 dm³ mieszano z 1 dm³ wody destylowanej w butlach ze szkła oranżowego zaopatrzonych w filtry 0,2 μ m. Zawartość butli intensywnie wstrząsano przez ok. 5 min, a następnie pozostawiano na 24 godziny, jednocześnie stosując napowietrzanie jałowym powietrzem (rys. 2).



Rys. 2. Wyposażenie wykorzystywane do biodegradacji

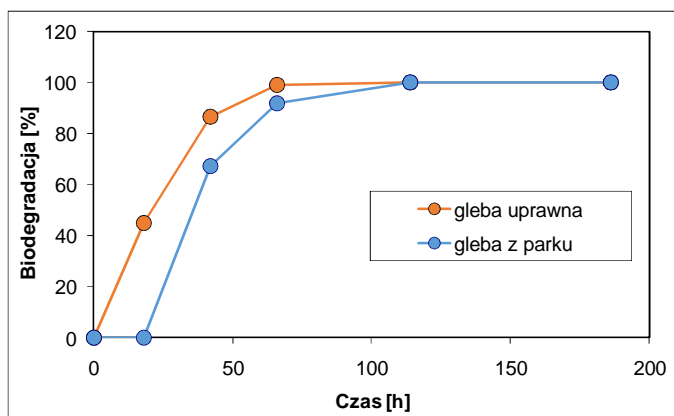
Fig. 2. Equipment for the aerobic biodegradation of samples

Po tym czasie z uzyskanych zawiesin pobierano próbki odniesienia, które poddawano analizie. Następnie, do zawiesin dodawano po 100 mg/dm³ stałej ampicyliny, intensywnie mieszano i ponownie pobierano próbki roztworu, które niezwłocznie analizowano. Zawiesiny zawierające ampicylinę napowietrzano w temperaturze pokojowej (ok. 25 °C) przez 15 dni, pobierając próbki w założonych odstępach czasu. Wszystkie pobrane próbki odwirowywano (5 min; 4000 rpm), a następnie określano ich skład metodą UPLC-QTOF (Waters) oraz wyznaczano toksyczność chroniczną względem mikroorganizmów inokulum. Identyfikację produktów biodegradacji ampicyliny dokonano na podstawie mas monoizotopowych oraz optymalizowanych widm fragmentacyjnych. Rozdział chromatograficzny prowadzono na kolumnie ACQUITY UPLC[®] BEH C18, 50 mm/1,7 µm. Fazę ruchomą stanowił 0,1 % roztwór HCOOH w wodzie (A) i 0,1 % roztwór HCOOH w acetonitrylu (B) w gradiencie (0 min - 95 % A i 5 % B; 2 min 80 % A i 20 % B; 2,3 min 30 % A i 70 % B; 3 min 30 % A i 70 % B; 3,3 min 95 % A i 5 % B; 4 min 95 % A i 5 % B) o przepływie 0,35 cm³/min w temperaturze 35 °C. Ponadto stosowano detektor Q-TOF (Xevo G2-XS, Waters) obsługiwany przez program MassLynx V4.1. Procedurę oznaczania toksyczności zastosowaną w eksperymencie szczegółowo opisano w pracach Wadhia i inni [11] Baran i inni [12], oraz Adamek i inni [13].

Wyniki badań i ich dyskusja

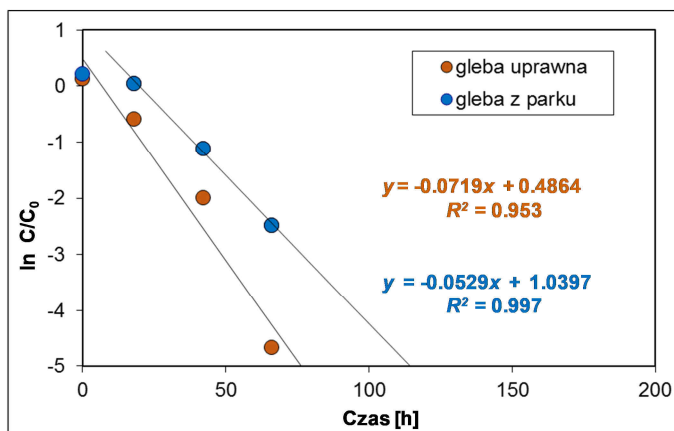
W napowietrzanych zawiesinach odcieków glebowych z pola uprawnego i z parku, do których dodano ampicylinę, stwierdzono szybki zanik stężenia tego antybiotyku. Proces ten przebiegał z większą szybkością w próbce zawierającej odciek z pola uprawnego. W próbce zawierającej odciek z gleby pochodzącej z parku obniżanie stężenia obserwowano dopiero po okresie adaptacji trwającej ok. 1 doby. Obserwacje te wskazują, że gleba z pola uprawnego nawożona nawozem naturalnym zawiera już mikroorganizmy

zaadaptowane do obecności antybiotyków β -laktamowych. W obu przypadkach stężenie ampicyliny uległo obniżeniu praktycznie do zera po 120 godzinach. Wstępnie założono, że opisane wyżej zjawisko jest związane z biodegradacją ampicyliny. Dynamikę tego procesu przedstawiono na rysunku 3.



Rys. 3. Dynamika aerobowej biodegradacji ampicyliny w odciekach glebowych

Fig. 3. The dynamics of aerobic biodegradation of ampicillin in soil leachate



Rys. 4. Kinetyka aerobowej biodegradacji ampicyliny w odciekach glebowych

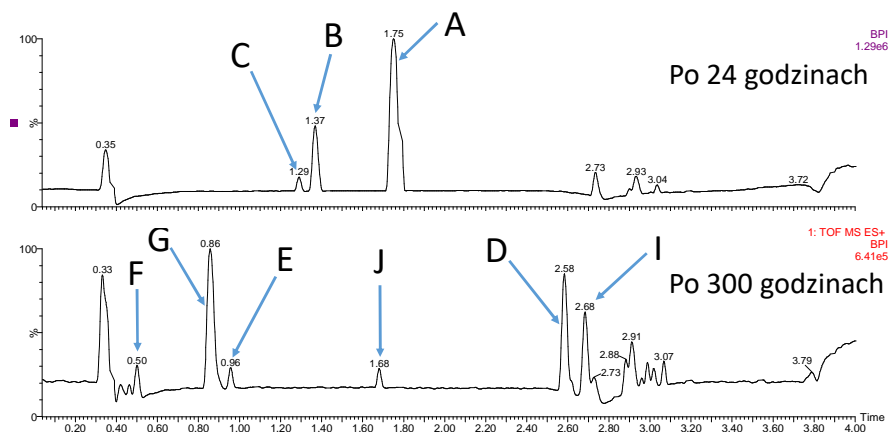
Fig. 4. The kinetics of aerobic biodegradation of ampicillin in soil leachate

Na rysunku 4 przedstawiono przebieg funkcji $\ln(C/C_0) = f(t)$ wyznaczonej dla obu eksperymentów. Prostoliniowy przebieg funkcji (w analizie funkcji nie uwzględniono czasu potrzebnego na adaptację mikroorganizmów) i wysoka wartość R^2 dowodzą, że omawiany proces jest pierwszorzędowy względem antybiotyku. Wyznaczone stałe szybkości biodegradacji ampicyliny w odciekach z gleby uprawnej i gleby pochodzącej z parku

wyniosły, odpowiednio, $0,072 \pm 0,011 \text{ h}^{-1}$ i $0,053 \pm 0,003 \text{ h}^{-1}$, a wyznaczone graficznie czasy półtrwania, odpowiednio, 21 i 36 godzin. Kumar i inni [14] stwierdzili, że w obecności *Verticillium leptobactrum* ampicylina ulega całkowitej biodegradacji w ciągu 7 dni. Z kolei, czas półtrwania amoksycyliny i cefaleksyny (również należących do β -laktamów) w glebie i osadzie czynnym wynosił, odpowiednio, ok. 0,5 doby oraz kilka godzin [5, 15]. Wyniki te są zbliżone do uzyskanych w naszym eksperymencie. Dla kontrastu, Gavalchin i Katz w 1994 roku donosili, że penicylina G nie ulega biodegradacji w obecności gnojowicy przez 30 dni [16].

W środowisku wodnym ampicylina ulega również procesowi hydrolizy abiotycznej. Proces taki został opisany m.in przez Mitchell i innych [17], choć jego szybkość jest znacznie niższa niż biodegradacji. Dla porównania, czas półtrwania ampicyliny w sterylnym roztworze wodnym w temperaturze $25 \text{ }^\circ\text{C}$ wynosi 27 dni. Fakt ten wskazuje, że obserwowany w naszym eksperymencie ubytek stężenia tego antybiotyku był wywołany obecnością drobnoustrojów.

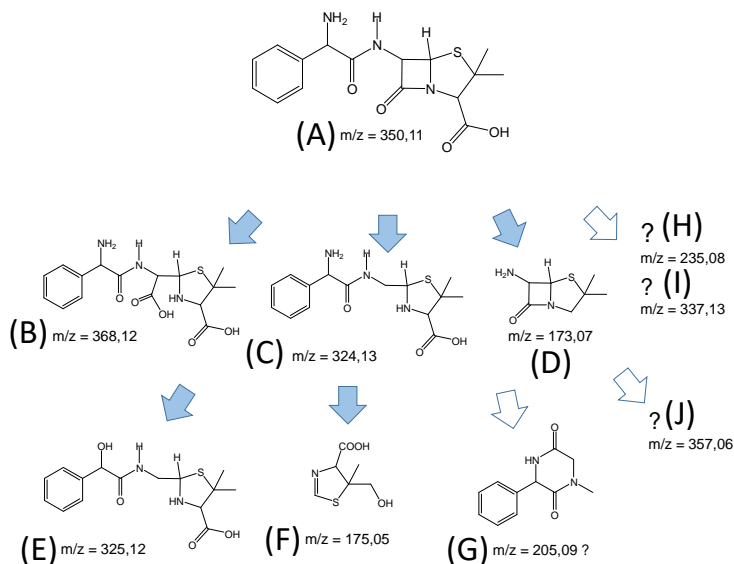
Aby prześledzić drogę biodegradacji ampicyliny w badanych próbkach, przeprowadzono ich rozdzielanie chromatograficzne metodą UPLC, a następnie podjęto próbę identyfikacji produktów z użyciem spektrometrii mas (Q-TOF). W tym celu porównano chromatogramy wyjściowe (uzyskane dla próbek pobranych bezpośrednio po przygotowaniu badanych mieszanin) oraz chromatogramy uzyskane po 24 i 300 godzinach biodegradacji (rys. 5). Zidentyfikowane produkty (odpowiadają im piki oznaczone literami od A do J, rys. 5) zestawiono na rysunku 6. Wypełnioną strzałką (rys. 6) oznaczono związki, co do identyfikacji których nie ma wątpliwości (B-E), otwartą strzałką oznaczono produkty zidentyfikowane jedynie na podstawie mas monoizotopowych (G) lub niezidentyfikowane (H-J).



Rys. 5. Chromatogramy próbki uzyskanej po trwającej 9 i 300 godzin biodegradacji ampicyliny w odcieku z gleby uprawnej

Fig. 5. Chromatograms of the sample after 9 and 300 hours biodegradation of ampicillin in soil leachate

Stwierdzono, że w trakcie biodegradacji ampicyliny w pierwszej kolejności zachodzą otwarcie pierścienia laktamowego i dekarboksylacja. Produkty tych reakcji zidentyfikowano w próbkach, które pobrano już po 24 godzinach biodegradacji (B i C na rys. 6). W dalszej kolejności powstawały produkty D, E i F. Taki przebieg procesu potwierdza udział w nim katalizujących hydrolizę β -laktamaz. Potwierdzeniem tego faktu jest występowanie identycznych substancji także w produktach abiotycznej hydrolizy ampicyliny [17]. Wśród produktów stwierdzono również obecność trwałego związku z zachowanym pierścieniem laktamowym (D). Mógł on powstać w wyniku hydrolizy wiązania peptydowego i dekarboksylacji ampicyliny.



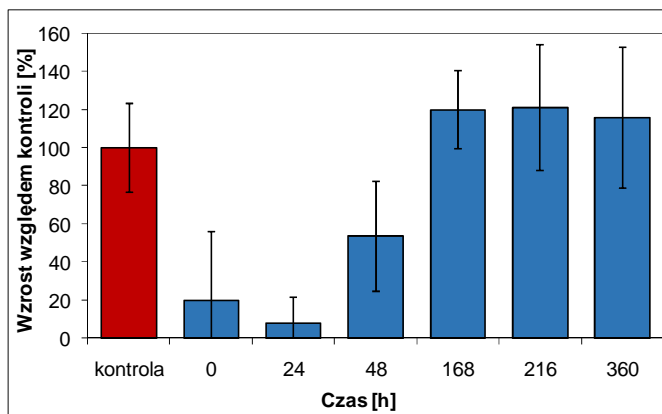
Rys. 6. Przewidywany przebieg biodegradacji ampicyliny w odcieku glebowym

Fig. 6. Proposed pathway of ampicillin biodegradation in soil leachate

Związek (D) może wykazywać potencjalną aktywność biologiczną. Z tego powodu za zasadne uznano dokonanie oceny toksyczności chronicznej próbek po biodegradacji. Jak już wspomniano, jako organizmy wskaźnikowe zastosowano inokulum zawierające nieselekcjonowane mikroorganizmy pochodzące z oczyszczalni ścieków komunalnych i z rzeki Brynicy. Uzyskane rezultaty przedstawiono na rysunkach 7 i 8.

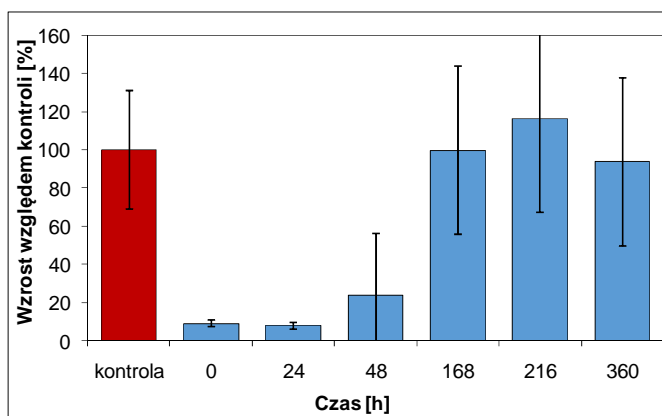
Niezależnie od zastosowanego inokulum, toksyczność chroniczna odcieków zawierających ampicylinę uległa redukcji do poziomu kontroli (pożywka bez antybiotyku) po 168 godzinach. Toksyczność obserwowana wcześniej, tzn. podczas biodegradacji trwającej krócej niż 48 godzin, była najprawdopodobniej związana z pozostałościami ampicyliny, obecnymi w próbkach. Oznacza to, że produkty biodegradacji tego antybiotyku nie są aktywne względem mikroorganizmów. W konsekwencji nie stanowią ryzyka z punktu widzenia generowania lekooporności w środowisku, do którego zostaną wprowadzone. Należy jednak mieć na uwadze to, że biodegradacja antybiotyku wymaga

udziału mikroorganizmów na niego opornych. Mikroorganizmy te również mogą przenikać do środowiska, stając się rezerwuarem niebezpiecznego materiału genetycznego [18, 19].



Rys. 7. Zmiany aktywności mikroorganizmów (pobranych z oczyszczalni ścieków) w roztworze zawierającym ampicylinę (100 mg/dm^3) i produkty jej biodegradacji

Fig. 7. Changes of microorganisms activity (collected from wastewater treatment plant) in a solution containing ampicillin (100 mg/dm^3) and its biodegradation products



Rys. 8. Zmiany aktywności mikroorganizmów pobranych z rzeki Brynicy obserwowane w roztworze zawierającym ampicylinę (100 mg/dm^3) i produkty jej biodegradacji

Fig. 8. Changes of microorganisms activity (collected from Brynica river) in a solution containing ampicillin (100 mg/dm^3) and its biodegradation products

Wnioski

Ampicylina ulega szybkiej biodegradacji w odciekach glebowych. W przypadku gleby pochodzącej z pola nawożonego nawozami naturalnymi nie była wymagana wcześniejsza adaptacja mikroorganizmów. Zidentyfikowane produkty wskazują, że biodegradacja antybiotyku przebiega na drodze (katalizowanej β -laktamazami) hydrolizy, która następnie

prowadzi do eliminacji grup funkcyjnych i otwarcia pierścienia β -laktamowego. Zidentyfikowano również trwały produkt zawierający zachowany pierścień laktamowy. Równie istotne jest to, że roztwór po biodegradacji ampicyliny nie jest toksyczny względem mikroorganizmów pochodzących ze środowiska. Oznacza to, że jego produkty nie stanowią zagrożenia dla mikrobiocenozy.

Literatura

- [1] The Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme (DANMAP) 2017. https://www.danmap.org/-/media/arkiv/projekt-sites/danmap/danmap-reports/danmap_2017_rapport_230519_low.pdf?la=en.
- [2] Polityka zdrowotna, Antybiotyki w weterynarii wykorzystywane coraz bardziej racjonalnie, <https://www.politykazdrowotna.com/37810,antybiotyki-w-weterynarii-wykorzystywane-coraz-bardziej-racjonalnie>.
- [3] Raport NIK z 8 marca 2018, NIK o stosowaniu antybiotyków w hodowli zwierząt (w woj. lubuskim), <https://www.nik.gov.pl/aktualnosci/nik-o-stosowaniu-antybiotykow-w-nbsp-hodowli-zwierzat-w-nbsp-woj-lubuskim.html>.
- [4] Krasucka D, Biernacki B, Szumiło J, Burmańczuk A. *Życie Weterynaryjne*. 2017;92(8):578-81. <http://agro.icm.edu.pl/agro/element/bwmeta1.element.agro-7dc7f065-6d00-45bc-832a-e27bbd3258c1/c/ZW-08-2017-09Monitoring.pdf>.
- [5] Cycóń M, Mroziak A, Piotrowska-Seget Z. *Front Microbiol*. 2019;10:338. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00338
- [6] Grenni P, Ancona V, Barra Caracciolo A. *Microchem J*. 2018;136:25-39. DOI: 10.1016/j.microc.2017.02.006.
- [7] Li J, Xin Z, Zhang Y, Chen J, Yan J, Li H, et al. *Appl Soil Ecol*. 2017;121:193-200. DOI: 10.1016/j.apsoil.2017.10.007.
- [8] Ghosh S, LaPara TM. The effects of subtherapeutic antibiotic use in farm animals on the proliferation and persistence of antibiotic resistance among soil bacteria. *ISME J*. 2007;1:191-203. DOI: 10.1038/ismej.2007.31.
- [9] Bondarczuk K, Sułowicz S, Piotrowska-Seget Z. Molekularne podstawy bakteryjnej oporności na ampicylinę. *Post Mikrobiol*. 2014;53:360-5. <http://www.pm.microbiology.pl/web/archiwum/vol5342014360.pdf>.
- [10] PN-ISO 10381-2. Jakość gleby. Pobieranie próbek. Część 2: Zasady dotyczące techniki pobierania. Warszawa: Polski Komitet Normalizacyjny; 2007. ISBN: 9788325117382.
- [11] Wadhia K, Dando T, Thompson KC. *J Environ Monit*. 2007;9:953-8. DOI: 10.1039/b704059h.
- [12] Baran W, Adamek E, Sobczak A. *Proc ECoPole*. 2015;9:533-40. DOI: 10.2429/proc.2015.9(2)062.
- [13] Adamek E, Baran W, Adamczyk R, Szymkiewicz A, Wilk J, Zielińska-Danch W. *Proc ECoPole*. 2018;12:107-15. DOI: 10.2429/proc.2018.12(1)010.
- [14] Kumar RR, Park BJ, Jeong HR, Ta Lee J, Cho JY. *J Pure Appl Microbiol*. 2013;7:3163-9. https://www.researchgate.net/profile/Ramasamy_Rajesh_Kumar2/publication/258106503_Biodegradation_of_b-lactam_antibiotic_'ampicillin'_by_white_rot_fungi_from_aqueous_solutions/links/5619234d08aea80367202e9b.pdf.
- [15] Li B, Zhang T. *Environ Sci Technol*. 2010;44:3468-73. DOI: 10.1021/es903490h.
- [16] Gavalchin J, Katz SE. The persistence of fecal-borne antibiotics in soil. *J Assoc Anal Chem Int*. 1994;77:481-5. DOI: 10.1093/jaoac/77.2.481.
- [17] Mitchell SM, Ullman JL, Teel AL, Watts RJ. *Sci Total Environ*. 2014;466-467:547-55. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.06.027.
- [18] Bouki C, Venieri D, Diamadopoulos E. *Ecotoxicol Environ Safety*. 2013;91:1-9. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2013.01.016.
- [19] Michael I, Rizzo L, McArdell CS, Manaia CM, Merlin C, Schwartz T, et al. *Water Res*. 2013;47:957-95. DOI: 10.1016/j.watres.2012.11.027.

AEROBIC DEGRADATION OF AMPICILLIN IN SOIL

Medical University of Silesia in Katowice, Sosnowiec, Poland

Abstract: Ampicillin is an antibiotic belonging to the beta-lactam group. It is widely used in veterinary medicine and therefore the residues are introduced into the soil with the livestock excreta. Such action could have a negative effect on soil microorganisms, including their biodiversity, and promote the development of drug resistance. The aim of our work was to determine the kinetics of ampicillin degradation initiated by soil microorganisms under aerobic conditions. The biodegradation products were identified using UPLC-QTOF. Additionally, the effects of these products on the microorganisms from the aquatic environment and the ones used in the MARA[®] bioassay were determined. It was found that the soil microorganisms caused the ampicillin degradation. The process proceeded mainly via elimination of one or more moieties from antibiotic molecule and opening of beta-lactam ring. In a result, a decrease in resultant chronic toxicity of ampicillin solutions to the test microorganisms was observed.

Keywords: antibiotics, biodegradation, mechanism, chronic toxicity