

Wojciech BARAN¹, Ewa ADAMEK¹, Alicja SZYMKIEWICZ² i Joanna WILK²

DYNAMIKA BIODEGRADACJI TYLOZYNY I IDENTYFIKACJA PRODUKTÓW TEGO PROCESU

THE DYNAMICS OF TYLOSIN BIODEGRADATION AND IDENTIFICATION OF PRODUCTS

Abstrakt: Tylozyna, należąca do grupy antybiotyków makrolidowych, jest powszechnie stosowana w hodowli zwierząt. Pozostałości tego leku wraz z odchodami zwierząt trafiają do wód powierzchniowych i gleb. Celem pracy było wyznaczenie dynamiki i ustalenie produktów degradacji tylozyny aplikowanej w dużych dawkach (od 30 do 200 mg/dm³) do osadu czynnego z oczyszczalni ścieków komunalnych, do odcieków glebowych pochodzących z pola uprawianego w sposób naturalny (tzn. nawożonego nawozem naturalnym) oraz z mieszanego ekosystemu leśnego. Proces biodegradacji prowadzono w warunkach aerobowych. Badania były poprzedzone wstępną oceną wrażliwości mikroorganizmów na tylozynę. Produkty degradacji antybiotyku w odciekach glebowych identyfikowano metodą UPLC/MS detektorem Q-TOF. Stwierdzono, że stężenie tylozyny wynoszące 80 mg/dm³ nie spowodowało zahamowania aktywności osadu czynnego. W tych warunkach uległa ona biotransformacji w czasie krótszym niż jedna doba. Najwyższe zastosowane stężenie tylozyny (200 mg/dm³) spowodowało zahamowanie wzrostu mikroorganizmów pochodzących ze wszystkich badanych próbek. Jedynie w próbkach odcieku z pola uprawnego po adaptacji zaobserwowano powolne, ale systematyczne obniżanie stężenia tego związku. Czas jego półtrwania ($t_{0,5}$) wyniósł ok. 38 dni. W tych próbkach zidentyfikowano również sześć produktów rozkładu tylozyny. Jej degradacja przebiegała najprawdopodobniej poprzez eliminację cząsteczek cukrowych, a następnie wskutek utlenienia laktenocyny i pierścienia laktonowego.

Słowa kluczowe: antybiotyki, środowisko, biodegradacja, mechanizm procesu biodegradacji.

Wprowadzenie

Tylozyna (rys. 1) należy do grupy naturalnych antybiotyków makrolidowych o właściwościach bakteriostatycznych, a w większych stężeniach do leków bakteriobójczych.

Preparaty dostępne w sprzedaży są mieszaniną tylozyny A oraz tylozyny B, tylozyny C i tylozyny D. Tylozyna A jest głównym składnikiem tej mieszaniny, a jej ilość w preparacie wynosi około 90% [1-5]. W krajach europejskich stosowana jest w weterynarii, głównie w zakażeniach układu oddechowego, moczowo-płciowego i skóry u bydła i trzody chlewnej. Tylozyna jest również jednym z promotorów wzrostu najczęściej dodawanym do paszy zwierząt hodowlanych w krajach pozaeuropejskich. Wchodzi w skład popularnego preparatu Tylan[®], stosowanego w celu zwiększenia masy i poprawy jakości mięsa [3, 4, 6].

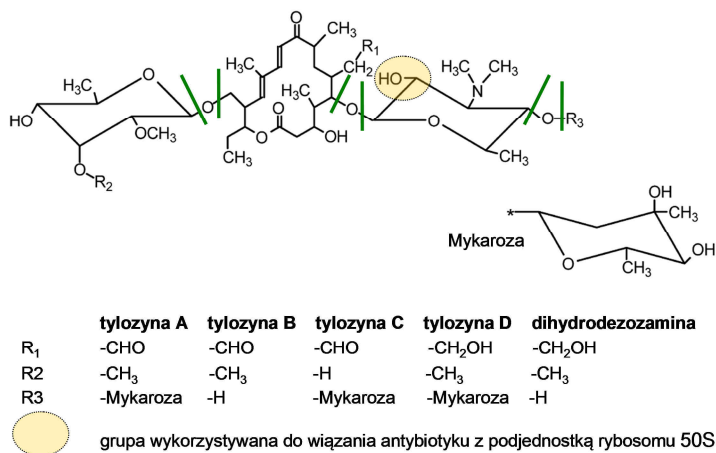
Aktywność tylozyny skierowana jest przeciwko szeregu drobnoustrojów Gram(-), Gram(+) oraz mykoplazmie. Mechanizm działania tylozyny, jak również innych antybiotyków makrolidowych, polega na zaburzeniu procesu translacji podczas syntezy

¹ Zakład Chemii Ogólnej i Nieorganicznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec, tel. 32 364 15 62, email: bw-xxl@wp.pl

² Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Chemii Ogólnej i Nieorganicznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec, tel. 32 364 15 62, email: eadamek@sum.edu.pl

Praca była prezentowana podczas konferencji ECOpole' 16, Zakopane, 5-8.10.2016

białek bakteryjnych wskutek ich związania z podjednostką 50S rybosomów bakteryjnych. W tworzeniu tego wiązania bierze udział jedna z grup hydroksylowych cząsteczki leku (rys. 1). Antybiotyki makrolidowe zostały wprowadzone do leczenia w pierwszej połowie lat 90. XX wieku, jednak niezwykle szybko pojawiły się szczepy bakterii chorobotwórczych odporne na te farmaceutyki [6].



Rys. 1. Struktury różnych form tylozyny [1]

Fig. 1. Structures of various forms of tylosin [1]

Tylozyna, podobnie jak inne leki wykorzystywane w weterynarii, może przedostawać się do środowiska wraz z odchodami zwierzęcymi [6-8]. Wskutek działania mikroorganizmów bytujących w ekosystemie, do którego została wprowadzona, może ona ulegać biodegradacji. Z drugiej strony, według Gao i in. [9], wydajność degradacji tylozyny podczas oczyszczania ścieków metodą biologiczną nie przekroczyła 30%.

Celem badań było określenie kinetyki aerobowej biodegradacji tylozyny przebiegającej w różnych ekosystemach oraz identyfikacja produktów tego procesu.

Materiały i metody

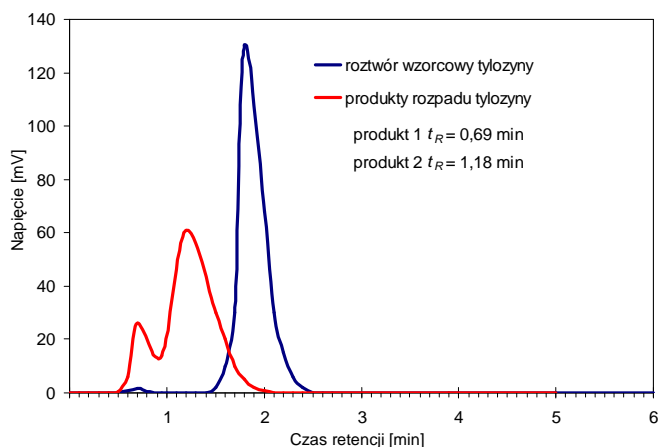
Do badań użyto winianu tylozyny (800 jednostek/mg, Sigma-Aldrich), wodę z rzeki Brynicy (pobraną w punkcie pomiarowym w Sosnowcu), osad czynny z komory tlenowej (pochodzący z oczyszczalni „Radocha II” w Sosnowcu), odciek z gleby uprawnej nawożonej nawozem naturalnym oraz odciek z gleby (pobranej w parku Dąbrowa Górnica - Zielona o charakterze naturalnego lasu mieszanego). Odcieki zostały przygotowywane przez zmieszanie równych objętości gleby i wody destylowanej. Po ich intensywnym wstrząśnieniu przez ok. 5 min mieszaniny pozostawiano na 30 minut (do naturalnej sedymentacji), a następnie zdekantowano natant, który bezzwłocznie wykorzystywano do przygotowania próbek zawierających tylozynę o stężeniu 200 mg/dm³. Z wody rzecznej i osadu czynnego przygotowano próbki zawierające ten lek o stężeniu odpowiednio 30 i 80 mg/dm³.

Proces biodegradacji prowadzono w warunkach aerobowych. Wykorzystana w nim aparatura oraz metodologia zostały szczegółowo opisane w pracy Adamek i in. [10]. W celu uwzględnienia ewentualnego udziału reakcji hydrolytycznych w procesie degradacji tylozyny w analogiczny sposób badano zmiany stężenia tego związku w wodzie destylowanej w warunkach sterylnych.

Badania zostały podzielone na dwa etapy. W pierwszym z nich dokonano oceny zmiany stężenia tylozyny w wodzie destylowanej, w wodzie pobranej z rzeki oraz w próbkach osadu czynnego. Po odwirowaniu wymienionych próbek (10 min, 4000 RPM) stężenie pozostałego leku oznaczano metodą HPLC (zestaw YL-9100; kolumna Hypersil C-18, 150 x 2,1 mm; faza ruchoma CH_3CN - 70% i H_3PO_4 o pH 2,7 - 30%; przepływ $1 \text{ cm}^3/\text{min}$; długość fali (λ) detektora - 290 nm). Do analizy chromatogramów wykorzystano program YL Clarity w wersji 3.0. W drugim etapie badań dokonano analizy składu odwirowanych próbek uzyskanych po biodegradacji tylozyny w odciekach glebowych. W tym celu zastosowano metodę MS-TOF ES^+ (zestaw UPLC/DAD i Xevo G2-XS-QTOF, Waters). Rozdziału dokonano na kolumnie Acquity UPLC BEH C18 (100 x 2,1 mm, przepływ $0,35 \text{ cm}^3/\text{min}$, faza ruchoma A - 0,01% roztwór HCOOH w wodzie, B - 0,01% roztwór HCOOH w CH_3CN ; gradient A: 0 min 95%, 5 min 70%, 6-7 min 30%, 8 min 95%). Do analizy chromatogramów wykorzystano program MassLynx V4.1.

Omówienie wyników

W pierwszym etapie badań oceniano proces degradacji tylozyny w wodzie destylowanej, w obecności osadu czynnego oraz w wodzie pobranej z rzeki Brynicy. Stwierdzono, że w wodzie destylowanej w warunkach septycznych stężenie tylozyny w czasie trwania eksperymentu (28 dni) praktycznie nie ulega zmianie.

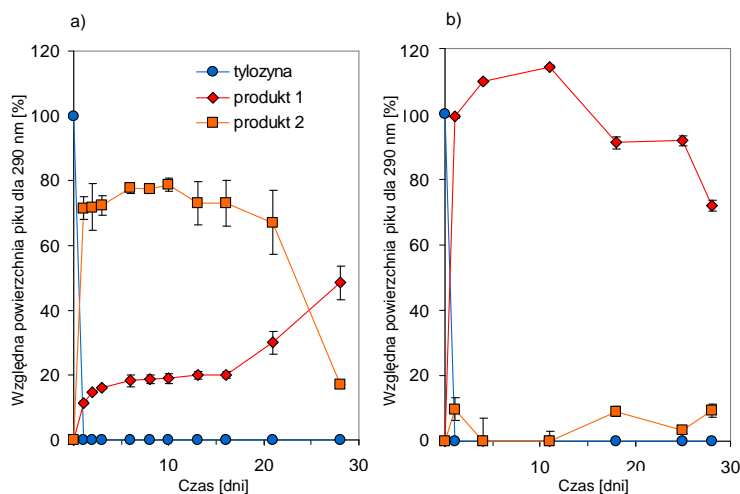


Rys. 2. Porównanie chromatogramów wzorcowego roztworu tylozyny i produktów jej rozpadu w osadzie czynnym w warunkach tlenowych po 24 godzinach

Fig. 2. Comparison of chromatograms of a standard tylosine solution (blue line) and its degradation products (red line) in the activated sludge under aerobic conditions and after 24 hours

Przykładowy chromatogram uzyskany w trakcie eksperymentów prowadzonych z użyciem osadu czynnego przedstawiono na rysunku 2. Po 24 godzinach napowietrzania w próbkach zarejestrowano (przy $\lambda = 290$ nm) dwa piki o czasach retencji (t_R) różnych od t_R piku wzorcowego roztworu antybiotyku (rys. 2).

Oznacza to, że w obecności osadu czynnego, a także w wodzie rzecznej już po 24 godzinach tylozyna uległa całkowitemu rozkładowi do przynajmniej dwóch produktów. Ich trwałość była znacznie większa niż trwałość tylozyny. Dynamikę zmian powierzchni pików odpowiadających prawdopodobnym produktom degradacji tego leku przedstawiono na rysunkach 3a i 3b.



Rys. 3. Zmiany względnej powierzchni pików odpowiadających tylozynie oraz produktom jej rozkładu podczas napowietrzania: a) roztworu antybiotyku w osadzie czynnym, b) w wodzie z rzeki Brynicy

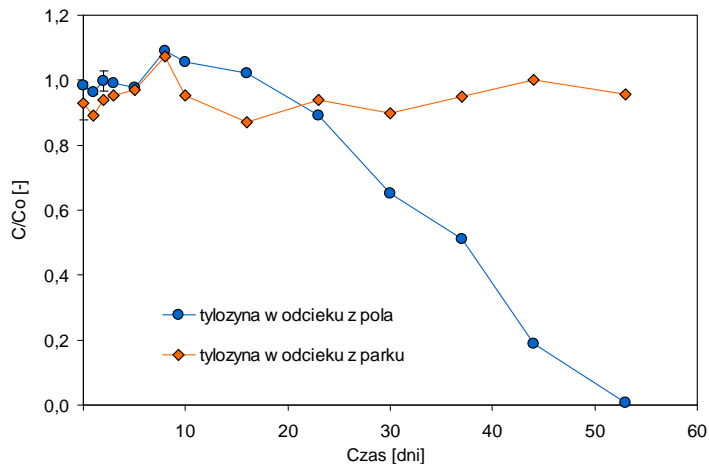
Fig. 3. Changes in relative peak areas of tylosin and its degradation products after aeration of the tylosin solution: a) in the activated sludge, b) in water from the Brynica river

Wyniki tych doświadczeń skłoniły autorów do dalszych prac, których celem była identyfikacja produktów degradacji tylozyny. Środowiskiem reakcji były odcieki glebowe, do których dodano antybiotyku w stężeniu 200 mg/dm^3 . Wartość ta jest kilka rzędów wyższa od stężenia tylozyny oznaczanego w rutynowych próbkach środowiskowych. Istnieją jednak prace wskazujące na to, że odchody zwierząt hodowlanych mogą zawierać porównywalnie wysokie stężenia antybiotyków [8].

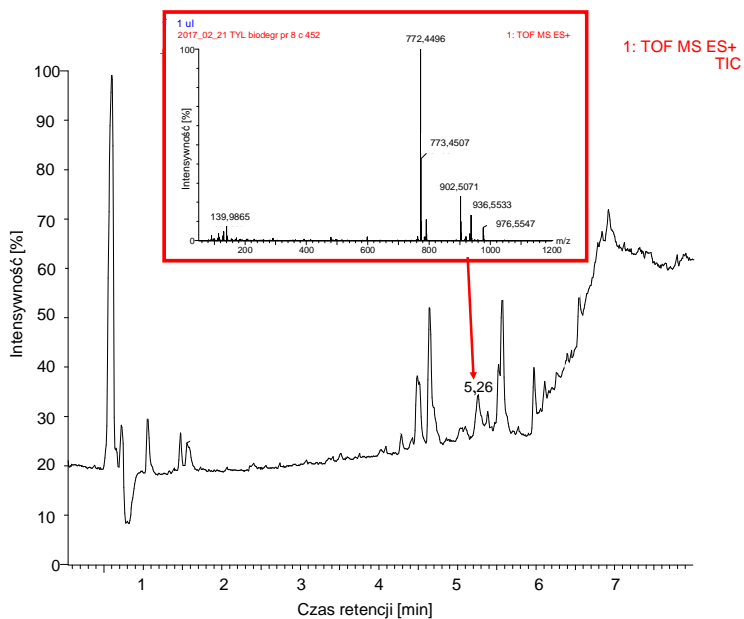
Zmiany stężenia tylozyny podczas trwającego 53 dni eksperymentu przedstawiono na rysunku 4. Zastosowanie tak wysokiego stężenia tylozyny spowodowało wyjałowienie środowiska reakcji. Najprawdopodobniej z tego powodu degradacja tylozyny zachodziła wyłącznie w próbkach odcieku pochodzącego z pola uprawnego i to po okresie adaptacji trwającym ok. 20 dni ($t_{0,5} \approx 38$ dni).

Przykładowy chromatogram uzyskany po 53 dniach napowietrzania próbki odcieku z pola uprawnego zawierającej dodaną tylozynę przedstawiono na rysunku 5. W tabeli 1

zestawiono wzory sumaryczne i nazwy zidentyfikowanych związków, będących prawdopodobnymi produktami biodegradacji.



Rys. 4. Zmiany stężenia tylozyny ($C_0 = 200 \text{ mg/dm}^3$) podczas degradacji aerobowej w odciekach glebowych
 Fig. 4. Changes in tylosin concentration ($C_0 = 200 \text{ mg/dm}^3$) during its aerobic degradation in the leachate soil



Rys. 5. Chromatogram i widmo MS-TOF uzyskane po 53 dniach napowietrzania roztworu tylozyny w odcieku glebowym

Fig. 5. Chromatogram and MS-TOF spectrum of the tylosin solution in the soil leachate after aeration for 53 days

Tabela 1

Substancje zidentyfikowane w roztworze po biodegradacji tylozyny w odcieku glebowym

Table 1

Identified substances in the solution after tylosin biodegradation in the soil leachate

Lp.	Czas retencji [min]	Oznaczona wartość m/z [M+H ⁺]	Prawdopodobny wzór	Teoretyczna wartość m/z [M+H ⁺] ¹	Prawdopodobna nazwa zidentyfikowanej substancji
1	0,72	208,1190	C ₈ H ₁₇ NO ₅	208,1185	2-deoksy-2-(dimetylamino)heksopiranoza
2	4,29	614,3549	C ₃₁ H ₅₁ NO ₁₁	614,3540	pochodna laktenocyny
3	4,49	614,3549	C ₃₁ H ₅₁ NO ₁₁	614,3540	pochodna laktenocyny
4	4,52	628,3333	C ₃₁ H ₄₉ NO ₁₂	628,3333	pochodna laktenocyny
5	5,00	612,3070	C ₃₁ H ₄₇ O ₁₂	612,3146	pochodna laktenocyny
6	5,26	772,4496	C ₃₉ H ₆₅ NO ₁₄	772,4483	tylozyna B
7	5,38	758,4290	C ₃₈ H ₆₃ NO ₁₄	758,4327	pochodna tylozyny B
8	5,57	437,2049	C ₂₃ H ₃₂ O ₈	437,2175	pochodna makrocyklicznego pierścienia laktonowego
9	6,14	916,5256	C ₄₆ H ₇₇ NO ₁₇	916,5270	tylozyna A
10	6,26	598,3597	C ₃₁ H ₅₁ NO ₁₀	598,3591	laktenocyna
11	6,92	193,1007	C ₈ H ₁₆ O ₅	193,1076	mycynoza

¹⁾ obliczone z użyciem aplikacji MassLynx V4.1

Niektóre ze zidentyfikowanych substancji występują również w dostępnych preparatach tylozyny. Tylozyna D, tylozyna B, dihydrodeozamina (C₃₉H₆₇NO₁₄) oraz tylozyna C mogą być zarówno produktami degradacji, jak i naturalnymi produktami ubocznymi biosyntezy tylozyny A [1, 5, 11-13]. W badanych próbkach nie potwierdzono jednak obecności dihydrodeozaminy, tylozyny C oraz tylozyny D. Z drugiej strony wykryto i zidentyfikowano takie produkty, jak laktenocyna, tylozyna B, mycynoza czy 2-deoksy-2-(dimetylamino)-heksopiranoza, a więc związki opisane w literaturze [1, 11, 12]. Zidentyfikowano również prawdopodobne produkty utlenienia (dehydratacji) laktenocyny (tabela 1, lp. 2, 3, 4 i 5) i pierścienia laktonowego (lp. 8). Przedstawione wyniki wskazują, że degradacja tylozyny przebiega głównie poprzez eliminację cząsteczek cukrowych, według schematu przedstawionego na rysunku 1 (zielone linie). Schemat taki jest również zgodny z wnioskami zaproponowanymi przez innych badaczy [1, 11, 14]. Kolejny etap degradacji może polegać na utlenianiu laktenocyny i pierścienia laktonowego.

Wnioski

Tylozyna w stężeniach 30 i 80 mg/dm³ nie powodowała zahamowania aktywności nieselekcjonowanych mikroorganizmów występujących, odpowiednio, w wodzie rzeki i w osadzie czynnym. W obu typach próbek uległa ona szybkiej biotransformacji. Z kolei, przy stężeniu 200 mg tylozyny/dm³ hamowała ona wzrost mikroorganizmów pochodzących z niemal wszystkich typów badanych próbek. Wyjątek stanowiły próbki odcieku z pola uprawnego, w których po wstępnym okresie adaptacji zaobserwowano powolne, ale systematyczne obniżanie stężenia leku ($t_{0,5} \sim 38$ dni). Zidentyfikowano również sześć produktów rozkładu tylozyny. Jej biodegradacja przebiega najprawdopodobniej poprzez eliminację cząsteczek cukrowych, a następnie utlenienie laktenocyny i pierścienia laktonowego.

Podziękowania

Badania były finansowane z grantu NCN nr UMO-2011/03/D/NZ7/01684.

Literatura

- [1] Kolz AC, Moorman TB, Ong SK, Scoggin KD, Douglass EA. *Water Environ Res.* 2005;77:49-56. <https://pubag.nal.usda.gov/pubag/downloadPDF.xhtml?id=39767&content=PDF>.
- [2] Ali M, Wang J, DeLaune R, Seo D, Dodla S, Hernandez A. *Chemosphere.* 2013;91:1583-1589. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.12.050.
- [3] Charakterystyka produktu leczniczego weterynaryjnego. http://opium.urpl.gov.pl/chplw/wet/TYLAN_G_100_PREMIX.pdf.
- [4] Landers T, Cohen B, Wittum T, Larson E. *Public Health Rep.* 2012;127:4-22.
- [5] Tylosin tartrate for veterinary use EUROPEAN PHARMACOPOEIA 5.0, http://library.njucm.edu.cn/yaodian/ep/EP5.0/16_monographs/monographs_q-z/Tylosin%20tartrate%20for%20veterinary%20use.pdf.
- [6] The Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme (DANMAP) 2014: Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. http://www.danmap.org/~media/Projekt%20sites/Danmap/DANMAP%20reports/DANMAP%202014/Danmap_2014.ashx.
- [7] Kümmerer K. *Chemosphere.* 2009;75:417-434. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2008.11.086.
- [8] Widyasari-Mehta A, Hartung S, Kreuzig R. *J Environ Manage.* 2016;177:129-137. DOI: 10.1016/j.jenvman.2016.04.012.
- [9] Gao L, Shi Y, Li W, Niu H, Liu J, Cai Y. *Chemosphere.* 2012;86:665-671. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2011.11.019.
- [10] Adamek E, Baran W, Sobczak A. *J Hazard Mater.* 2016;313:147-158. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2016.03.064.
- [11] Hu D, Fulton B, Henderson K, Coats J. *Environ Sci Technol.* 2008;42:2982-2987. http://lib.dr.iastate.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1312&context=ent_pubs.
- [12] Loke ML, Ingerslev F, Halling-Sørensen B, Tjørnelund J. *Chemosphere.* 2000;40:759-765. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653599004506>.
- [13] Ingerslev F, Halling-Sørensen B. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2001;48:311-320. DOI: 10.1006/eesa.2000.2026.
- [14] Mitchell SM, Ullman JL, Teel AL, Watts RJ. *Chemosphere.* 2015;134:504-511. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.08.050.

THE DYNAMICS OF TYLOSIN BIODEGRADATION AND IDENTIFICATION OF PRODUCTS

^{1,2}Medical University of Silesia in Katowice

Abstract: Tylosin, an antibiotic belonging to the class of macrolide antibiotics, is commonly used in animal husbandry. Its residues enter the surface water and soil with animal waste. The aim of the study was to determine the dynamics and products of tylosin degradation. The antibiotic was added at high concentration (from 30 to 200 mg/dm³) to the activated sludge from municipal WWTP, to the soil leachate (from natural farming, i.e. field fertilized with manure) and to the mixed forest ecosystem. The biodegradation process was carried out under aerobic conditions. The experiment was preceded by a preliminary assessment of the microorganisms sensitivity to tylosin. Antibiotic degradation products in the leachate samples were identified by UPLC/MS methods using a Q-TOF detector. It was found that tylosin at a concentration of 80 mg/dm³ did not inhibit the sludge activity. In these samples the biotransformation of antibiotic proceeded fast in the time shorter than one day. Tylosin at the highest concentration (200 mg/dm³) inhibited the growth of microorganisms present in all environmental samples. However, a slow but systematic decrease in tylosin concentration was observed in leachate samples from cultivated field after their adaptation ($t_{0.5} \sim 38$ days). Six degradation products of tylosin were identified in these samples. Tylosine degradation likely proceeds through an elimination of the sugar molecules and subsequent oxidation of the lactone ring and lactenocin.

Keywords: antibiotics, environment, biodegradation mechanism