

Słowa kluczowe: toksyczność, chemioterapeutyki, *Vibrio fischeri*, MARA

Grzegorz NAŁĘCZ-JAWECKI\*, Anna PIEKAREK\*, Józef SAWICKI\*

## ZASTOSOWANIE TESTU BAKTERYJNEGO MARA DO OCENY EKOTOKSYCZNOŚCI LEKÓW

Test MARA (Microbial Assay for Risk Assessment) to innowacyjny system oceny toksyczności chronicznej próbek wykorzystujący jako bioindykatory dziesięć bakterii o różnej taksonomii i jeden organizm eukariotyczny – drożdże. Celem niniejszej pracy była ocena wrażliwości systemu MARA na wybrane chemioterapeutyki stosowane w weterynarii i porównanie uzyskanych wyników z wrażliwością chronicznego, 24-godzinnego testu na bakteriach luminescencyjnych *Vibrio fischeri*. Powstały na płycie MARA swoisty, niepowtarzalny wzór określany terminem FIP (fingerprint) był charakterystyczny dla różnych grup antybiotyków. Zaproponowano nowy, oryginalny, graficzny sposób prezentowania FIP. Oba testy wykazały bardzo wysoką wrażliwość na tetracyklinę i kwas oksolinowy na poziomie około 20 µg/l. Test MARA był 40-razy bardziej wrażliwy niż *V. fischeri* na streptomycynę a 4-krotnie mniej wrażliwy na chloramfenikol.

### 1. WSTĘP

Leki stanowią nową, wielką grupę ksenobiotyków, na którą zwraca się w ostatnich latach coraz większą uwagę [3,5]. Ponad połowa produkowanych leków przeznaczona jest do leczenia zwierząt. Wraz z rozwojem ferm wielkotowarowych odnotowuje się wzrost produkcji i zużycia leków weterynaryjnych. Obecnie produkcja w krajach UE sięga 4700 ton substancji czynnych rocznie. Szczególna uwaga zwrócona jest na antybiotyki i leki przeciwpasożytnicze stosowane u zwierząt w celach leczniczych i profilaktycznych. Stanowią one ponad połowę ogółu leków weterynaryjnych [7]. Wspomniane grupy leków często stosowane są w sposób masowy (leczenie i profilaktyka całego stada, a nie tylko pojedynczej sztuki).

Leki weterynaryjne stosowane u zwierząt hodowlanych trafiają do środowiska różnymi drogami: mogą być bezpośrednio aplikowane do wód (w hodowli ryb), gleb (na pastwiskach), pośrednio - poprzez otwarty system kanalizacji bądź w formie gnojowicy i gnojówki mogą być wywożone na pola. Stają się wówczas niekontrolowanym źródłem zanieczyszczeń środowiska oraz przyczyniają się do zaburzenia równowagi w ekosystemach (glebowym i wodnym).

---

\* Zakład Badania Środowiska, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

Stosowanie coraz większych dawek znanych od lat antybiotyków ze względu na rosnącą antybiotykooporność, wprowadzanie nowych chemioterapeutyków do leczenia weterynaryjnego oraz zwiększanie liczby wielostanowiskowych ferm przemysłowych powoduje zwiększone zanieczyszczenie tymi związkami i ich metabolitami środowiska naturalnego. Dodatkowym problemem jaki obserwujemy w naszym kraju jest niekorzystna dla środowiska struktura stosowanych antybiotyków. W Polsce często jeszcze stosowane są w dużej ilości antybiotyki o znacznej toksyczności np tetracykliny i chloramfenikol, których 50–80% stosowanej dawki trafia do środowiska [6].

Test MARA (Microbial Assay for Risk Assessment) to innowacyjny system oceny toksyczności chronicznej próbek wykorzystujący jako bioindykatory dziesięć organizmów prokariotycznych – bakterii o różnej taksonomii i jeden eukariotyczny – drożdże. Liofilizowane bioindykatory umieszczone są przez producenta w celkach polistyrenowej mikropłytki (96-dołkowej), która jest następnie w warunkach aseptycznych hermetycznie pakowana. Dzięki temu do testu MARA nie jest konieczne prowadzenie hodowli organizmów testowych wymagającej odpowiedniego zaplecza mikrobiologicznego i generującej dodatkowe koszty. Zastosowanie do oceny toksyczności próbki mikroorganizmów, których niewielkie rozmiary umożliwiają przeprowadzenie testu jednocześnie na milionach organizmów testowych zebranych na niewielkiej powierzchni, znacząco usprawnia proces oceny toksyczności, obniża jego koszty, a także zwiększa wiarygodność uzyskiwanych wyników [5]. Dodatkowo zastosowanie w jednym teście 11 różnych pod względem taksonomicznym i genetycznym organizmów pozwala stworzyć warunki testowe lepiej odzwierciedlające te panujące w prawdziwym ekosystemie niż testy jednogatunkowe. Badanie toksyczności próbki na wielu organizmach jednocześnie także znacząco zwiększa czułość testu (wzrasta prawdopodobieństwo, iż przynajmniej jeden z bioindykatorów okaże się wrażliwy na badaną próbkę [7]).

W systemie MARA toksyczność próbki oceniana jest na podstawie stopnia zahamowania wzrostu organizmów testowych po 18 godzinach inkubacji. Czerwień tetrazoliowa dodawana do pożywki jest redukowana przez zdrowe bakterie do nierozpuszczalnego w wodzie czerwonego barwnika. Płytkę jest następnie skanowana, a jej obraz analizowany przez specjalny program analizy obrazu.

Celem niniejszej pracy była ocena wrażliwości systemu MARA na wybrane chemioterapeutyki stosowane w weterynarii i porównanie uzyskanych wyników z wrażliwością bakterii luminescencyjnych *Vibrio fischeri*.

## 2. MATERIAŁY I METODY

### 2.1. BADANE ZWIĄZKI

Oceniono 6 chemioterapeutyków: streptomycynę, tetracyklinę, chloramfenikol, kwas nalidyksowy, kwas pipemidynowy oraz kwas oksolinowy. Wzorce badanych leków zakupiono w firmie Sigma-Aldrich.

### 2.2. SYSTEM MARA

Wszystkie elementy systemu MARA: mikro płytki, odczynniki, program analizy obrazu zakupiono od producenta poprzez Tigret. Analizy wykonano zgodnie z instrukcjami producenta. W skrócie: liofilizowane mikroorganizmy umieszczone w rzędzie H mikro płytki zrehydratowano i preinkubowano przez 4 godziny w temperaturze 30°C. W rzędach G-B mikro płytki wykonano szereg sześciu rozcieńczeń próbki w postępie geometrycznym o ilorazie = 3. Do rzędu A wprowadzono pożywkę (kontrola szczepów). Następnie do każdego rozcieńczenia próbki dodano mikroorganizmy pobrane z rzędu H. Wszystkie czynności wykonywano przy użyciu elektronicznej pipety 12-kanałowej. Mikro płytkę inkubowano w temperaturze 30°C. Po 18 godzinach płytki skanowano w skanerze płaskim. Wyniki opracowywano przy użyciu specjalnego programu analizy obrazu, który umożliwił obliczenie wartości MTC (Microbial Toxic Concentration) dla każdego szczepu.

### 2.3. BAKTERIE LUMINESCENCYJNE

Wyniki toksyczności chronicznej badanych substancji dla bakterii *Vibrio fischeri* uzyskano z prac Backhaus i Grimme [1] oraz Backhaus i in. [2]. Przedstawiono wartości 24h-EC50.

## 3. WYNIKI

### 3.1. SYSTEM MARA

Powstały na 96-celkowej płytce swoisty, niepowtarzalny wzór określany jest terminem FIP (fingerprint). Pozwala on nie tylko na analizę toksycznego działania badanej próbki na poszczególne szczepy mikroorganizmów, ale przede wszystkim umożliwia zaobserwowanie zależności między intensywnością reakcji toksycznej a rodzajem organizmu przejawiającego tę reakcję oraz stwierdzenie czy badana próbka wykazuje toksyczność ogólną – zaobserwowaną u większości bioindykatorów, czy specyficzną, obserwowaną tylko dla jednego szczepu [4,8].

Dla lepszego porównywania FIP różnych substancji przedstawiono je na specjalnie opracowanym wykresie. W tym celu wartości MTC przekształcono na jednostki toksyczności:  $TU = 100 / MTC$ , a następnie obliczono procent TU dla każdego szczepu przyjmując wartość TU dla najbardziej wrażliwego szczepu za 100%.

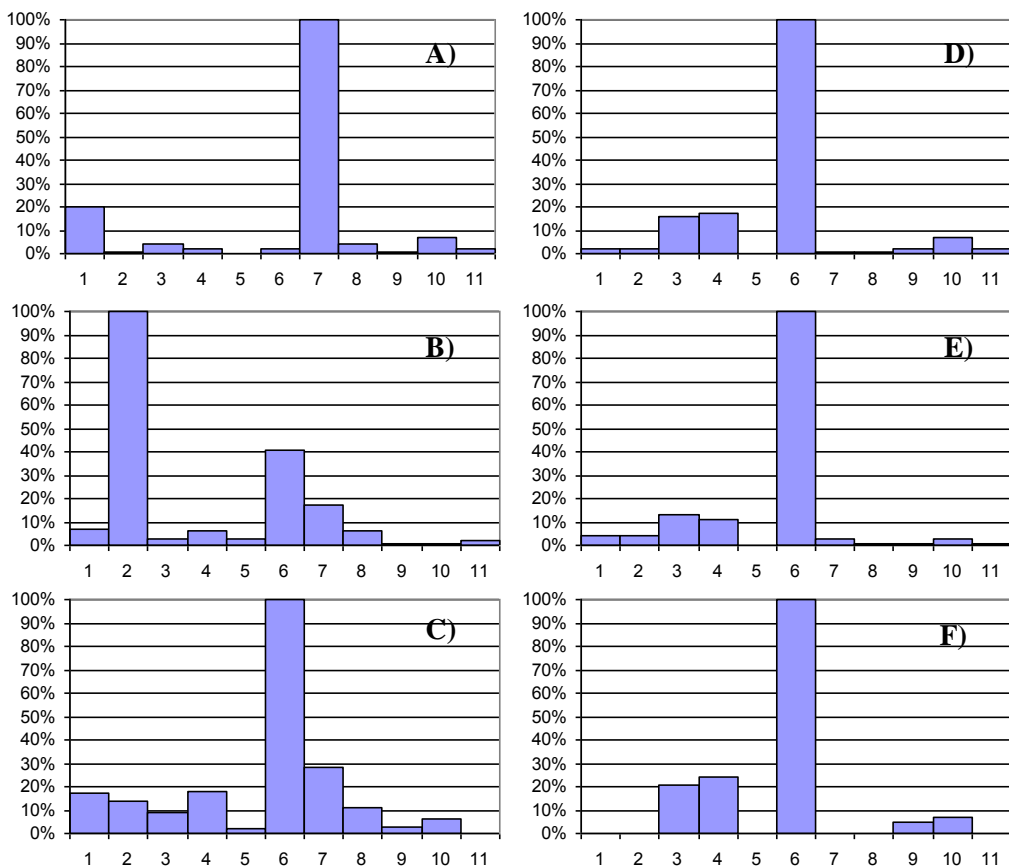
Zastosowane szczepy mikroorganizmów reagowały w różnym stopniu na badane substancje (rys. 1). Na streptomycynę najbardziej wrażliwy był szczep 7, następnie 1, zaś wzrost pozostałych szczepów praktycznie nie uległ zahamowaniu. Odmienny obraz uzyskano w przypadku tetracykliny. Szczep 2 był najbardziej wrażliwy, następnie 6 i 7 (odpowiednio 40% i 18% maksymalnej czułości), pozostałe mikroorganizmy były co najmniej 10-krotnie mniej wrażliwe. Chloramfenikol i chinolony wykazały największą toksyczność dla szczepu 6. Jednakże chloramfenikol działał toksycznie także na większość pozostałych szczepów – wrażliwość powyżej 10% wrażliwości maksymalnej wykazały szczepy: 7, 4, 1, 2, 8 oraz 3.

Natomiast chinolony oprócz 6 działały negatywnie tylko na dwa szczepy: 3 i 4. Na uwagę zasługuje fakt, iż FIP kwasów: nalidyksowego, oksolinowego i pipemidynowego są bardzo podobne – czyli stosunek wrażliwości poszczególnych szczepów zastosowanych w teście MARA był zbliżony. Można stąd wysnuć wnioski, iż leki te mają to samo spektrum działania przeciwbakteryjnego, aczkolwiek różnią się siłą tego działania. W Tabeli 1 przedstawiono minimalne wartości MTC dla każdej badanej substancji. Są to wartości uzyskane dla najbardziej wrażliwego szczepu w teście MARA. Jak widać spośród chinolonów najbardziej toksyczny był kwas oksolinowy powodujący zaburzenie wzrostu bakterii już w stężeniu 13  $\mu\text{g/l}$ . Kwasy nalidyksowy i pipemidynowy były odpowiednio prawie 15 i 30 razy mniej toksyczne.

### 3.2. PORÓWNANIE WRAŻLIWOŚCI SYSTEMU MARA I BAKTERII *V. FISCHERI*

W tabeli 1 zamieszczono wyniki toksyczności uzyskane przez Backhaus [1,2] w 24-godzinnym teście chronicznym z bakteriami luminescencyjnymi *V. fischeri* oraz minimalne wartości MTC uzyskane w teście MARA w niniejszej pracy. Oba testy wykazują bardzo wysoką wrażliwość na tetracyklinę i kwas oksolinowy. Antybiotyki te były oznaczane w ściekach na podobnym poziomie - kilkunastu  $\mu\text{g/l}$ . Wskazuje to na możliwość toksycznego oddziaływania tych związków na wrażliwe mikroorganizmy. Test MARA jest zdecydowanie bardziej wrażliwy niż *V. fischeri* na streptomycynę. Z drugiej strony bakterie luminescencyjne reagują na 4-krotnie niższe stężenia chloramfenikolu.

Przedstawione wyniki wskazują na wysoką wrażliwość systemu MARA na badane chemioterapeutyki. Należy zwrócić uwagę na fakt, iż na różne grupy leków zareagowały różne szczepy mikroorganizmów.



Rys. 1. Wzory toksyczności - FIP (fingerprints) związków w teście MARA.  
 A) Streptomycyna; B) Tetracyklina; C) Chloramfenikol; D) Kwas nalidyksowy;  
 E) Kwas oksolinowy; F) Kwas pipemidynowy.

Stąd zastosowanie w jednym teście aż 11 mikroorganizmów podnosi znacznie jego wrażliwość, ale także umożliwia wstępne scharakteryzowanie spektrum przeciwbakteryjnego działania badanej próbki. System MARA może pełnić ważną rolę w zestawie testów przeznaczonych do oceny ekotoksyczności istniejących i nowoprowadzanych leków. Jednocześnie może służyć do monitoringu środowiska pod kątem toksyczności próbek dla mikroflory.

Tabela 1. Porównanie toksyczności badanych związków dla bakterii luminescencyjnych oraz najbardziej wrażliwego szczepu w teście MARA.

Związek	<i>Vibrio fischeri</i> 24h-EC50[μg/l]	MARA minimalne MTC [μg/l]
Chloramfenikol	64 [1]	250
Streptomycyna	8210 [1]	190
Tetracyklina	25 [1]	16
Kwas nalidyksowy	200 [2]	190
Kwas pipemidynowy	1019 [2]	410
Kwas oksolinowy	23 [2]	13

#### PODZIĘKOWANIA

Badania finansowano ze środków Ministerstwa Nauki (grant nr N305 270134) oraz z tematu statutowego Zakładu Badania Środowiska WUM.

#### LITERATURA

- [1] Backhaus T., Grimme L.H. 1999. *The toxicity of antibiotic agents to the luminescent bacterium Vibrio fischeri*. Chemosphere 38: 3291-3301.
- [2] Backhaus T., Scholtze M., Grimme L.H. 2000. *The single substance and mixture toxicity of quinolones to the bioluminescent bacterium Vibrio fischeri*. Aquat Toxicol. 49: 49-61.
- [3] Fent K., Weston A. A., Caminada D. 2006. *Ecotoxicology of human pharmaceuticals*. Aquat Toxicol. 76: 122-159.
- [4] Gabrielson J., Kühn I. 2003. *Microplate-based microbial assay for risk assessment and (eco)toxic fingerprinting of chemicals*. Anal Chim Acta 485: 121-130.
- [5] Halling-Sorensen B., Nielsen S.N., Lanzky P.F., Ingerslev F., Holten-Lützhof H.C., Jorgensen S.E. 1998. *Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – a review*. Chemosphere 36: 357-393.
- [6] Halling-Sorensen B., Sengeklov G., Tjornelund J. 2002. *Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria*. Arch Environ Contam Toxicol. 42: 263-271.
- [7] Koschorrek J., Koch C., Rönnefahrt I. 2002. *Environmental risk assessment of veterinary medicinal products in EU – a regulatory perspective*. Toxicol Lett. 131: 117-124.
- [8] Wadhia K., Dando T., Thompson C. 2007. *Intra-laboratory evaluation of Microbial Assay for Risk Assessment (MARA) for potential application in the implementation of the Water Framework Directive (WFD)*. J Environ Monit. 9: 953-958.

#### APPLICATION OF MICROTOX® AND MARA BIOTESTS IN EVALUATION OF ECOTOXICITY OF PHARMACEUTICALS

MARA - Microbial Assay for Risk Assessment is a new chronic bioassay, which uses ten species of Prokaryota and one Eucaryotic yeast. The goal of the study was the evaluation of sensitivity of MARA to selected veterinary chemioterapeutics and comparison of the results with the sensitivity of chronic 24-h test with luminescent bacteria *Vibrio fischeri*. The unique MARA fingerprint is specific for each group of antibiotics. In this study new way of presentation of the fingerprint is proposed. Both MARA and luminescent bacteria test were the most sensitive to tetracycline and oxolinic acid at the level close to 20 μg/l. MARA was 40-folds more sensitive than *V. fischeri* to streptomycin, while 4-times less sensitive to chloramfenicol.