

UNIVERZA V NOVI GORICI
FAKULTETA ZA ZNANOSTI O OKOLJU

**ZADRŽEVANJE IN STABILNOST SULFAMETOKSAZOLA IN
CIPROFLOKSACINA V TLE**

DIPLOMSKO DELO

Maja Kranjc

Mentor: prof. dr. Mladen Franko

Nova Gorica, 2013

IZJAVA

Izjavljam, da je diplomsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Rezultati, ki so nastali v okviru skupnega raziskovanja z drugimi raziskovalci, ali so jih prispevali drugi raziskovalci (strokovnjaki), so eksplicitno prikazani oziroma navedeni (citirani) v diplomskem delu.

Maja Kranjc

ZAHVALA

Za nastanek diplomskega dela od zasnove do končne oblike se iskreno zahvaljujem svojemu mentorju prof. dr. Mladenu Franku, ki me je s svojimi izkušnjami, znanjem in potrpežljivostjo ves čas usmerjal in mi pomagal. Zahvala gre tudi vsem raziskovalcem Laboratorija za raziskave v okolju za pomoč pri laboratorijskem delu.

Za vse spodbude, podporo in brezpogojno ljubezen se globoko zahvaljujem svojim dragim staršem, bratu in sestri. Hvala, ker ste mi ves čas stali ob strani in verjeli vame.

POVZETEK

Diplomsko delo obravnava zadrževanje in stabilnost dveh, v živinoreji zelo pogosto uporabljenih antibiotikov - sulfametoksazola in ciprofloksacina. Sta predstavnika skupine sulfonamidov in fluorokinolonov s popolnoma drugačnimi lastnostmi in obnašanjem v tleh. Ciprofloksacin velja za slabo mobilnega, ima visoko afiniteto do tal in je težko razgradljiv. Nasprotno velja za sulfametoksazol, da je v tleh močno mobilnen, zato velja za nizko reaktivnega in se v tleh ne zadržuje. V laboratoriju smo zastavili kolonski poizkus z dvema različnima tipoma tal, na katere smo nanесли znane koncentracije obeh antibiotikov. S simuliranjem padavin smo iz kolon dobili vzorce izcedne vode, katere smo analizirali s pomočjo kromatografa HPLC. Rezultati analiz HPLC so pokazali, da se je pri količini vode, ki ustreza količini padavin 180 L/m² (količina dodane vode na kolono v treh dneh) iz kolon izločil le sulfametoksazol, ciprofloksacina pa nismo zaznali v nobenem od vzorcev tudi po dodatku vode, ki ustreza količini padavin 530 L/m² (količina dodane vode na kolono v devetih dneh). Ugotovili smo tudi, da sta oba antibiotika v vodni raztopini stabilna in se v času poizkusa njuna koncentracija ni spreminjala. Rezultati se ujemajo z našimi predpostavkami in podatki iz literature ter kažejo, da z vidika ekološkega kmetijstva in uporabe hlevskega gnoja sulfametoksazol ni sporen in se izloči iz tal tudi v področjih z najnižjo količino padavin v Sloveniji. Glede na povprečno količino letnih padavin v Sloveniji 1396 L/m² (Statistični urad Republike Slovenije, 2013) pa na osnovi opravljenih raziskav zanesljivejših zaključkov za primer ciprofloksacina ne moremo dati.

Ključne besede: antibiotiki, sulfametoksazol, ciprofloksacin, kromatograf HPLC, zadrževanje v tleh

SUMMARY

The thesis reports on the results experiments which aimed to elucidate the retention and stability of two very commonly used veterinary antibiotics – sulfamethoxazole and ciprofloxacin in soil. These are two members of sulphonamides and fluoroquinolones groups with completely different properties and behavior in the soil system. Ciprofloxacin is poorly mobile, has a high affinity to soil and is not readily degradable. On the other hand, sulfamethoxazole is characterized by high mobility in the soil system, low reactivity and short retention in the soil. In the laboratory we set up a column experiment with two different types of soil on which we applied known concentrations of both antibiotics. By simulated rainfall we collected leachate samples from the columns, which were analyzed by HPLC chromatography. Results of HPLC analysis showed that adding water equivalent to precipitation of 180 L/m² only sulfamethoxazole leached from the columns, while ciprofloxacin was not detected in any of the samples after the simulated precipitation of 530 L/m². Our spectrophotometric measurements have also shown that both antibiotics are stable in solution and their concentration did not change during the experiments. The results are consistent with our assumptions and data from the literature and show that from the perspective of organic farming and the use of manure sulfamethoxazole is not problematic and is removed from soil also in the regions of Slovenia with the lowest amount of precipitation. Given the average amount of precipitation in Slovenia (1396 L/m²) we can not make conclusions regarding the ciprofloxacin based on performed experiments.

Key words: antibiotics, sulfamethoxazole, ciprofloxacin, HPLC chromatography, retention in soil

KAZALO VSEBINE

1 UVOD	1
1.1 Namen in cilji diplomskega dela	3
2 TEORETIČNE OSNOVE	4
2.1 Tetraciklini	5
2.1.1 Kemične lastnosti	5
2.1.2 Mobilnost, akumulacija, obstojnost in razgradnja	6
2.2 Makrolidi	6
2.2.1 Kemične lastnosti	6
2.2.2 Mobilnost, akumulacija, obstojnost in razgradnja	7
2.3 Penicilini	7
2.3.1 Kemične lastnosti	8
2.3.2 Mobilnost, akumulacija, obstojnost in razgradnja	8
2.4 Sulfonamidi	8
2.4.1 Kemične lastnosti	9
2.4.2 Mobilnost, akumulacija, obstojnost in razgradnja	9
2.4.3 Sulfametoksazol	9
2.5 Fluorokinoloni	10
2.5.1 Kemične lastnosti	11
2.5.2 Mobilnost, akumulacija, obstojnost in razgradnja	11
2.5.3 Ciprofloksacin.....	11
2.6 Analitske metode	13
3 EKSPERIMENTALNI DEL	14
3.1 Reagenti in raztopine	14
3.2 Pripomočki in aparature	14
3.3 Odvzem vzorcev tal	15
3.4 Priprava vzorcev tal za analizo	16
3.4.1 Sušenje vzorcev tal in določanje vlage	16
3.5 Priprava kolon	17
3.6 Polnjenje kolon	17
3.6.1 Gostota vzorcev tal in mrtvi volumen kolon	18
3.7 Izvedba poskusa	19
3.7.1 Določanje pH vzorcev izcednih vod	20
3.8 Analiza vzorcev na kromatografu HPLC	20
3.9 Ugotavljanje stabilnosti sulfametoksazola in ciprofloksacina	21
4 REZULTATI IN DISKUSIJA	22
4.1 Določitev vlage v vzorcih tal	22
4.2 Gostota vzorcev tal in mrtvi volumen kolon	23
4.3 Meritve pH vzorcev	24
4.4 Določitev retencijskega časa sulfametoksazola in ciprofloksacina	24
4.5 Umeritvena premica za sulfametoksazol in ciprofloksacin	27
4.6 Določanje spodnje meje detekcije	28
4.7 Analize vzorcev izcedne vode s HPLC	30
4.8 Ugotavljanje stabilnosti sulfametoksazola in ciprofloksacina	35
5 ZAKLJUČKI	38
6 VIRI	39

SEZNAM PREGLEDNIC

Tabela 1: Fizikalno-kemijske lastnosti sulfametoksazola	10
Tabela 2: Fizikalno-kemijske lastnosti ciprofloksacina	12
Tabela 3: Kromatografski pogoji za HPLC	21
Tabela 4: Določanje vlage v vzorcih tal iz vzorčevalnega mesta 1.....	22
Tabela 5: Določanje vlage v vzorcih tal iz vzorčevalnega mesta 2.....	23
Tabela 6: Gostota vzorcev tal iz vzorčevalnih mest 1 in 2	23
Tabela 7: Mrtvi volumen kolon z vzorci tal iz vzorčevalnih mest 1 in 2.....	23
Tabela 8: Rezultati meritev pH vzorcev izcedne vode	24
Tabela 9: Analize vzorcev izcedne vode tal iz vzorčevalnega mesta 1	31
Tabela 10: Analize vzorcev izcedne vode tal iz vzorčevalnega mesta 2	33

SEZNAM SLIK

Slika 1: Veterinarski antibiotiki v okolju: možne poti vnosa (Kemper, 2007: 5).....	2
Slika 2: Osnovna kemijska zgradba tetraciklinov (zgoraj) in trije glavni predstavniki (spodaj) (Sarmah et al., 2006: 738).....	5
Slika 3: Osnovna kemijska zgradba tilozina (Jacobsen et al., 2004: 158).....	7
Slika 4: Osnovna kemijska zgradba penicilinov (Joshi S., 2001: 796)	8
Slika 5: Osnovna kemijska zgradba sulfonamidov (Joshi S., 2002: 805)	9
Slika 6: Kemijska zgradba sulfametoksazola (Gao et al., 2011)	10
Slika 7: Osnovna kemijska zgradba fluorokinolonov (Carlucci G., 1998)	11
Slika 8: Kemijska zgradba ciprofloksacina (Vasudevan et al., 2009)	12
Slika 9: Zračni posnetek vasi Log pod Mangartom z označenim mestom odvzema vzorcev tal (Vir: http://maps.google.com/)	15
Slika 10: Zračni posnetek kraja Šempeter pri Gorici z označenim mestom odvzema vzorcev tal (Vir: http://maps.google.com/)	16
Slika 11: Sestavljene kolone iz polipropilenskih kanalizacijskih cevi	17
Slika 12: Kolone napolnjene z dvema različnima tipoma tal	18
Slika 13: Potek zbiranja vzorcev v 100 mL merilne valje	20
Slika 14: Kromatograma standardne raztopine sulfametoksazola in ciprofloksacina dobljena z DAD detektorjem (zgoraj) in FLD detektorjem (spodaj)	25
Slika 15: Kromatogram realnega vzorca (DAD detektor pri 270 nm)	26
Slika 16: Kromatogram izcedne vode iz kontrolne kolone z vzorcem tal iz vzorčevalnega mesta 1 (DAD detektor pri 270 nm).....	26
Slika 17: Umeritvena premica za sulfametoksazol	27
Slika 18: Umeritvena premica za ciprofloksacin	28
Slika 19: Umeritvena premica za določanje LOD za sulfametoksazol	29
Slika 20: Umeritvena premica za določanje LOD za ciprofloksacin	29
Slika 21: Spreminjanje koncentracije sulfametoksazola v frakcijah izločenih iz kolone z vzorcem tal iz vzorčevalnega mesta 1	32
Slika 22: Izločen masni delež sulfametoksazola iz vzorcev tal iz vzorčevalnega mesta 1	32
Slika 23: Spreminjanje koncentracije sulfametoksazola v frakcijah izločenih iz kolon z vzorcem tal iz vzorčevalnega mesta 2	34
Slika 24: Izločen masni delež sulfametoksazola iz vzorcev tal iz vzorčevalnega mesta 2	34
Slika 25: Spreminjanje absorpcijskega spektra sulfametoksazola v času	36
Slika 26: Spreminjanje absorpcijskega spektra ciprofloksacina v času	36

SEZNAM OKRAJŠAV

TC = tetraciklin

OTC = oksitetraciklin

CTC = klorotetraciklin

TYL = tilozin

CIP = ciprofloksacin

SMZ = sulfametoksazol

HPLC = tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti (high performance liquid chromatography)

ACN = acetonitril

LOD = spodnja meja detekcije (limit of detection)

1 UVOD

Klasična Waksmanova definicija antibiotike opredeli kot naravne snovi, ki jih proizvajajo specifični mikroorganizmi in imajo uničujoče ali zaviralne učinke na patogene bakterije v razredčenih raztopinah (Waksman, 1942). Sodobna definicija antibiotikov je precej širša. V besedi antibiotik so zajete snovi, ki so proizvod metabolizma živih organizmov in imajo visoko selektivno inhibicijsko aktivnost na določene mikroorganizme ter rakaste celice. Danes uporabljamo poleg naravnih antibiotikov še naravnemu proizvodu enake sintetične ali podobne polysintetične antibiotike.

Obdobje antibiotikov se je pričelo s spoznanjem, da plesni proizvajajo presnovke, ki so škodljivi za druge mikroorganizme. Pomemben mejnik v zgodovini antibiotikov je leto 1928, ko je A. Fleming iz proizvoda glive *Penicillium notatum* izoliral aktivno učinkovino imenovano penicilin. Po tem odkritju se je začela tudi industrijska proizvodnja antibiotikov. Leta 1946 se je začel proizvajati streptomycin in leta 1950 klorotetraciklin, s čimer je človeštvo pridobilo najbolj učinkovita zdravila proti številnim infekcijskim boleznim (Gubina in Ihan, 2002).

Antibiotike lahko klasificiramo na različne načine, najpogosteje na osnovi kemijske zgradbe, na osnovi mikroorganizmov, ki proizvajajo posamezne antibiotike, po mehanizmu delovanja, po spektru delovanja ter po načinu njihovega pridobivanja. Po spektru delovanja antibiotike ločimo na ozkospektralne in širokospektralne. Po mehanizmu delovanja pa jih delimo na bakteriostatike, fungistatike in na protozoostatike glede na to, ali zavirajo rast bakterij, gliv ali praživali oziroma glede na to, ali uničijo mikroorganizme (baktericidi, fungicidi in protozoocidi) (Marolt-Gomišček, 1992).

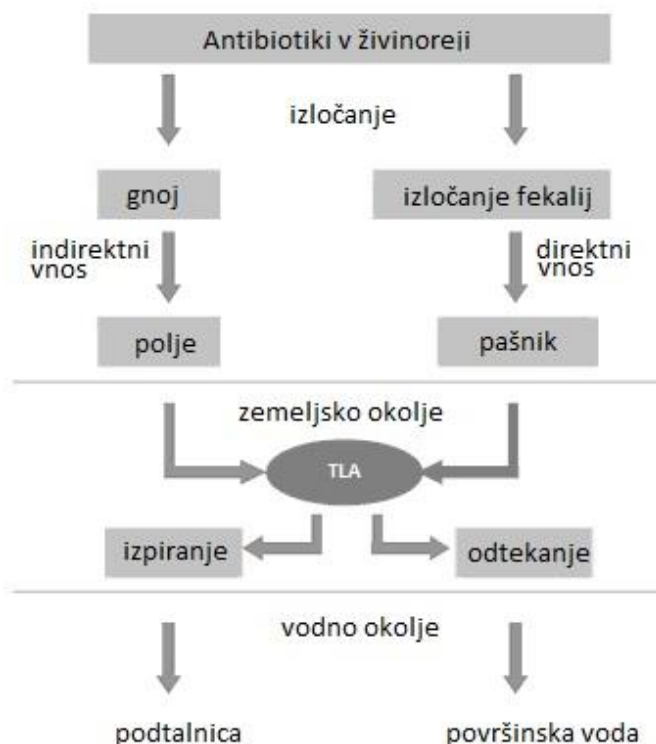
Antibiotiki se za zdravljenje in preprečevanje infekcijskih boleznih uporabljajo ne samo v humani medicini, temveč tudi za zdravljenje rastlin in živali.

V posebno skupino antibiotikov prištevamo skupino, ki se uporablja v živinoreji, največkrat kot dodatek živalski hrani. Njihov namen je pospeševanje rasti, boljša izkoriščenost krme in izboljšanje drugih fizioloških lastnosti živali. Za to skupino se uporablja izraz antibiotični pospeševalci rasti (AGP – antibiotic growth promoters) (Sarmah et al., 2006).

Poudarek diplomskega dela je na veterinarskih antibiotikih, ki jih uporabljamo pri živalih za proizvodnjo hrane. Od leta 1950 veterinarske antibiotike v živinoreji uporabljamo za zdravljenje in preprečevanje infekcijskih boleznih, spodbujanje rasti, za boljšo izkoriščenost krme ter za nadzorovanje parazitov in nenalezljivih boleznih (Rice in Straw, 1996). Neustrezna in prekomerna uporaba protimikrobnih zdravil pri živalih lahko povzroča velike vplive na okolje. Kljub temu da o tem še ni veliko znanega in so si mnenja nasprotujoča, uporaba antibiotikov lahko vpliva na talne in vodne ekosisteme ter pospešuje razvoj mehanizmov odpornosti mikroorganizmov (Kemper, 2007).

Večina antibiotikov, ki jih uporabljamo pri živalih za proizvodnjo hrane, se v črevesju slabo absorbira, kar pomeni, da se večina zaužite količine antibiotikov najpogosteje nespremenjene in v aktivni obliki izloči z iztrebki in s sečem. Z uporabo živalskega gnoja ali gnojevke kot organskega gnojila na kmetijskih površinah lahko antibiotiki preidejo v okolje, bodisi kot prvotne spojine, njihovi metaboliti ali razgradni produkti. Z izpiranjem ali površinskim odtokom lahko tako preidejo v tla, površinske in podzemne

vode (Kümmerer et al., 2000; UCS, 2001; Thiele-Bruhn, 2003). Možne poti vstopa antibiotikov v okolje so shematsko prikazane tudi na Sliki 1.



Slika 1: Veterinarski antibiotiki v okolju: možne poti vnosa (Kemper, 2007: 5)

V strokovni literaturi se pojavlja podatek, da se iz telesa živali lahko izloči od 30-90 % nespremenjene matične spojine (Alcock et al., 1999). Po nekaterih podatkih se lahko kar 90 % enega odmerka izloči s sečem in do 75 % z iztrebki (Halling-Sørensen, 2001). Metaboliti antibiotikov so lahko tudi bioaktivni in se po ekskreciji lahko pretvorijo nazaj v izvorno spojino (Langhammer, 1989). Količina izločenega antibiotika se spreminja glede na uporabljeno vrsto antibiotika, načina vnosa, višine odmerka pa tudi od vrste in starosti osebka, ki je antibiotik prejel (Katz, 1980; Haller et al., 2001).

Učinkovitost in delovanje antibiotikov v okolju je, tako kot pri drugih organskih kemikalijah, odvisna od njihovih fizikalno-kemijskih lastnosti, prevladujočih klimatskih razmer, vrste tal in mnogo drugih okoljskih dejavnikov. Kakšna je njihova kemijska narava, proces razgradnje, obseg pojavnosti, mobilnost in obnašanje v okolju, ko se substance izločijo iz organizma, je le malo znanega.

1.1 Namen in cilji diplomskega dela

Namen diplomskega dela je ugotoviti in oceniti zadrževanje in stabilnost antibiotikov sulfametoksazola in ciprofloksacina v tleh, kar bomo storili s pregledom obstoječih podatkov o veterinarskih antibiotikih in njihovih metabolitih, s pregledom znanstvene literature s področja meritev antibiotikov ter z izvedbo laboratorijskih poizkusov in meritev.

V okviru diplomskega dela smo si zastavila naslednje cilje:

- s pregledom znanstvene literature ugotoviti, kaj je znanega na področju pojavljanja veterinarskih antibiotikov v tleh ter
- s pomočjo meritev in izvedbo laboratorijskega poizkusa preučiti zadrževanje in stabilnost izbranih veterinarskih antibiotikov ter njihovih morebitnih metabolitov v različnih tipih tal.

2 TEORETIČNE OSNOVE

Ko se uporabljeni antibiotiki iz organizma izločijo, se lahko z biotskimi ali abiotskimi procesi v okolju izlužijo, adsorbirajo, akumulirajo ali degradirajo. Pogosto se antibiotiki sprostijo v okolje v le malo spremenjeni obliki oziroma popolnoma nespremenjeni in konjugirani v polarne molekule. Kemično in fizikalno obnašanje antibiotikov v tleh je odvisno od njihove molekularne zgradbe. Antibiotiki so ionizirani, amfifilni ali amfoterični, zaradi česar imajo sposobnost adsorpcije v tleh. Zaradi fizikalno-kemičnih lastnosti, kot so njihova molekularna zgradba, velikost, oblika, topnost in hidrofobnost, se sorpcija in vezava v tleh pri različni vrstah antibiotikov precej razlikujeta. Njihova učinkovitost proti mikroorganizmom se praviloma s sorpcijo in fiksacijo zmanjšuje, kar pa ne pomeni nujno, da se s tem njihova antimikrobna aktivnost popolnoma izniči (Sengeløv et al., 2003).

Nekateri antibiotiki so v tleh obstojni, medtem ko drugi razpadejo relativno hitro. Razpad antibiotikov v tleh je odvisen od mnogih dejavnikov. Fotodegradacija v tem primeru ne igra velike vloge, saj so antibiotiki v gnoju, gnojevki in kasneje v tleh pred svetlobo zaščiteni (Sengeløv et al., 2003). Razpad v tleh poteka pretežno zaradi mikrobne aktivnosti (biodegradacija), predvsem z encimskimi reakcijami, v katerih se s hidrosilicijo in oksidativno dekarboksilacijo prvotne spojine pretvorijo (Al-Ahmed et al., 1999). Četudi se razpadni produkti v okolju lahko pretvorijo v izhodne substance, se antibiotiki ponavadi še naprej razgrajajo v gnoju in tleh (Ingerslev in Halling-Sørensen, 2000).

O mobilnosti antibiotikov v tleh obstaja le malo študij. Glede mobilnosti antibiotikov v tleh nekatere raziskave navajajo podatek, da večina snovi ostane v zgornjih nekaj centimetrih tal, kar lahko nakazuje na njihovo visoko sorpcijsko afiniteto (Ingerslev in Halling-Sørensen, 2001). Kot pri drugih organskih kemikalijah je tudi mobilnost veterinarskih antibiotikov odvisna od več dejavnikov. Stopnjo mobilnosti lahko določajo kemične lastnosti, temperatura in vsebnost vlage tal, čas uporabe gnoja ali gnojevke kot tudi prevladujoče vremenske razmere. Na mobilnost antibiotikov v tleh lahko vpliva tudi vrsta drugih dejavnikov, kot so topnost v vodi, disociacijska konstanta, sorpcijski oziroma desorpcijski procesi, stabilnost in vezava v tleh ter pH (Sarmah et al., 2006).

Izbrane in podrobneje opisane veterinarske antibiotike se v živinoreji pogosto uporablja. Poleg tega imajo različne sorpcijske in degradacijske karakteristike, širok razpon fizikalno-kemičnih lastnosti, obstojnosti in mobilnosti ter se v veliki meri v okolje izločijo v nespremenjeni obliki. Izbrani antibiotiki spadajo v skupine tetraciklinov, makrolidov, penicilinov, sulfonamidov in fluorokinolonov.

V eksperimentalnem delu diplomskega dela smo uporabili dva tipična antibiotika, ki se intenzivno uporabljata v živinoreji ter spadata med tiste antibiotike, ki so najpogosteje detektirani v površinskih in podzemnih vodah. Uporabili smo sulfametoksazol iz skupine sulfonamidov in ciprofloksacin iz skupine fluorokinolonov.

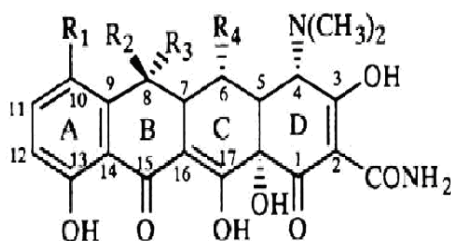
2.1 Tetraciklini

Tetraciklini so bakteriostatični antibiotiki s širokim spektrom delovanja. Med seboj se razlikujejo predvsem po farmakoloških lastnostih, kot so absorpcija, topnost v vodi in hitrosti izločanja.

Tetraciklin (TC), oksitetraciklin (OTC) in klorotetraciklin (CTC) v živalih pogosto uporabljamo za vzdrževanje zdrave populacije in kot pospeševalce rasti. Tetraciklini se različno resorbirajo iz prebavil. Najmanj se resorbira CTC (25 %), mnogo bolje TC, najbolje pa minociklin in doksiciklin (skoraj 100 %). Približno 20% peroralno danega in od 60 do 70 % parenteralno danega tetraciklina se izloči s sečem v aktivni obliki (Elmund et al., 1971; Berger et al., 1986; Marolt, 1992). Resorpcija vseh tetraciklinov iz prebavil se močno zmanjša, če so zaužiti skupaj s hrano. Prisotni dvovalentni in trivalentni ioni nekaterih kovin, kot so kalcij, aluminij in železo, namreč tvorijo s tetraciklini netopne komplekse, kelate, kar otežuje njihovo absorpcijo skozi črevesno steno in s tem zmanjša njihovo biološko razpoložljivost. Razlog za nepopolno absorpcijo je tudi slaba topnost tetraciklinov v alkalnem mediju.

2.1.1 Kemične lastnosti

Za tetracikline je značilen osnovni kemični skelet, ki ga sestavljajo štiri šestčlenski obroči. Med seboj se razlikujejo po različnih substituentah na obročih, kar prikazuje tudi Slika 2. Molekula tetraciklina ima več ioniziranih funkcionalnih skupin, naboj molekule pa je odvisen od pH-ja raztopine. Tetraciklin vsebuje tri različne kislinske funkcionalne skupine: trikarbonilni sistem, dimetil amonijev kation in fenolni diketon. Večkratno ionizirane funkcionalne skupine prisotne v tetraciklinih so razlog za to, da lahko pri normalnem pH-ju v okolju (pH 4-8) obstajajo kot kationi (+ 0 0), zwitterioni (+ - 0) ali kot neto negativno nabiti ioni (+ - -). Tetraciklini so relativno stabilni v kislem mediju, soli pa tvorijo v obeh, tako v kislem kot v bazičnem mediju (Halling-Sørensen et al., 2002). V splošnem so te spojine slabo oziroma zmerno topne v vodi.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Tetraciklin (TC)	H	CH ₃	OH	H
Klorotetraciklin (CTC)	Cl	CH ₃	OH	H
Oksitetraciklin (OTC)	H	CH ₃	OH	OH

Slika 2: Osnovna kemijska zgradba tetraciklinov (zgoraj) in trije glavni predstavniki (spodaj) (Sarmah et al., 2006: 738)

2.1.2 Mobilnost, akumulacija, obstojnost in razgradnja

Mobilnost tetraciklinov je odvisna od različnih dejavnikov, predvsem od tipa tal. V splošnem je za tetracikline značilno, da se v tleh močno adsorbirajo (Rabølle in Spliid, 2000). Raziskave navajajo podatek, da se tetraciklini po aplikaciji organskega gnojila pojavljajo v tleh v večjih količinah kot ostali antibiotiki ter da so v tleh lahko dolgo obstojni in se akumulirajo (Hamscher et al., 2002; Yong-Song et al., 2010). Da se tetraciklini lahko tako močno vežejo na v tleh prisotno organsko snov, je posledica njihove sposobnosti formiranja kompleksov z dvovalentnimi in trivalentnimi ioni nekaterih kovin, ki so prisotni v glinenih mineralih (npr. v kaolinitu, montmorilonitu, illitu itd.) (Samuelsen et al., 1992). Zaradi tega je za tetracikline značilno, da se pojavljajo v večjih koncentracijah v zgornjih plasteh tal, manjše koncentracije pa so lahko po daljšem obdobju prisotne tudi v globljih plasteh (Hamscher et al., 2002).

V raziskavi Hamscherja in sodelavcev (Hamscher et al., 2002) pa so rezultati pokazali večje koncentracije TC in CTC na globini 20-30 cm kot v zgornjih plasteh tal (0-10 cm). Avtorji so kot možno razlago pojave pripisali dodatnemu sproščanju vezanih ostankov v obliki 4-epi-tetraciklina (4-epi TC), ki je optični izomer oziroma metabolit tetraciklina (Kühne et al., 2000; Hamscher et al., 2002).

Tetraciklini imajo visok sorpcijski koeficient in se zato navadno ne pojavljajo v vzorcih vode. Vendar pa visok sorpcijski koeficient še ne pomeni nemobilnosti substanc, kar potrjuje tudi dejstvo, da so tetraciklini lahko prisotni tako v zgornjih kot tudi v globljih plasteh tal. Sorpcija tetraciklinov je odvisna od več dejavnikov, najpomembnejša pa sta pH in kationska izmenjalna kapaciteta tal (Sassman in Lee, 2005).

Številne raziskave z oksitetraciklinom so pokazale, da se le-ta v tleh lahko akumulira in je zelo obstojen. Večina raziskav navaja, da je OTC bolj stabilen kot TC in CTC ter ima večji potencial za akumulacijo v tleh (Pinck et al., 1961; Blackwell et al., 2007; Yong-Song et al., 2010). Prav zaradi tega OTC predstavlja precej večje tveganje za onesnaženje tal kot pa površinskih in/ali podzemnih voda (Boxall et al., 2006).

Ker se pri normalnem pH-ju v okolju (pH 4-8) tetraciklini pojavljajo kot kationi, zwitterioni in anioni, je zanje zapleteno in težko predvideti sorpcijo in transport v mediju, še posebej v tleh (Boxall et al., 2006).

Razgradnja tetraciklinov je abiotska, močno odvisna od pH-ja, redoks potenciala, svetlobnih pogojev in temperature (Clive, 1968). Na obstojnost v tleh pa poleg tega lahko vplivajo tudi variacije v populaciji, gostoti in vrsti mikroorganizmov.

2.2 Makrolidi

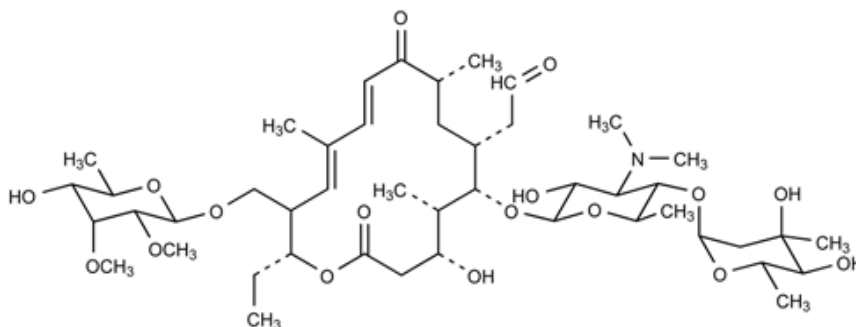
Makrolidi so antibiotiki, ki v nižjih koncentracijah delujejo bakteriostatsko, v višjih pa bakteriocidno. Antibakterijski spekter delovanja makrolidov je širok.

2.2.1 Kemične lastnosti

Makrolidi so antibiotiki, ki imajo v kemični zgradbi makrociklični laktonski obroč s 14 ali 16 členi. Danes uporabljamo predvsem polsintetični derivat eritromicina azitromicina, ki

ima 15 členov. Topnost večine makrolidnih antibiotikov je visoka in narašča z naraščanjem polarnosti topila.

Tilozin (TYL), ki ga v živinoreji zelo pogosto uporabljamo, dobro poznan tudi kot pospeševalec rasti, je nestabilen v kislem in alkalnem mediju in relativno stabilen pri nevtralnem pH. Njegova kemijska zgradba je prikazana na Sliki 3.



Slika 3: Osnovna kemijska zgradba tilozina (Jacobsen et al., 2004: 158)

2.2.2 Mobilnost, akumulacija, obstojnost in razgradnja

Iz strokovne literature je najbolj znan tilozin, ki ga uporabljamo izključno samo v veterinarski medicini. Za tilozin je znano, da se hitro razgradi že v gnoju oziroma gnojevki (Loke et al., 2000) ali tleh (Ingerslev in Halling-Sørensen, 2001).

Tilozin se v številnih raziskavah ni pojavil ne v vzorcih tal ne v vzorcih vode (Kay et al., 2004; Boxell et al., 2006). Rezultati potrjujejo dejstvo, da tilozin, apliciran skupaj z gnojem ali gnojevko, ne predstavlja velikega tveganja za kopičenje v tleh ali za onesnaženje podzemnih in/ali površinskih voda. Tveganje pa lahko predstavljajo njegovi razgradni produkti, ki nastanejo med skladiščenjem gnoja ali gnojevke. Ker se med skladiščenjem ne razgradijo dokončno, lahko kot taki vstopijo v okolje (Boxall et al., 2004; Kolze et al., 2005).

2.3 Penicilini

Penicilini spadajo med betalaktamske antibiotike in delujejo baktericidno. Njihov antibakterijski spekter je različen. Prvotni penicilini so bili sorazmerno ozko delujoči, danes pa obstaja vrsta sintetičnih in polysintetičnih derivatov, ki so širokospektralni. So najbolj razširjena skupina antibiotikov tako v humani kot v veterinarski medicini. V slednji jih pogosto uporabljamo tudi kot pospeševalce rasti. Danes ločimo:

- standardne peniciline (penicilin G, penicilin V),
- antistafilokokne peniciline (meticilin, oksacilin, nafcilin) in
- širokospektralne peniciline (aminopenicilini, karboksipenicilini, ureidopenicilini) (Gubina in Ihan, 2002).

Penicilin se zelo hitro izloči iz telesa, kar rešujejo z velikimi odmerki. Eliminacija penicilina poteka večinoma preko ledvic (90 % s tubulno sekrecijo).

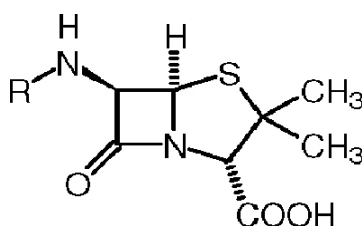
2.3.1 Kemične lastnosti

Molekulska formula penicilinov je $R-C_9H_{11}N_2O_4S$, kjer je R spremenljiva stranska veriga. Osnovna zgradba penicilinov je kondenziran štiričlenski betalaktamski obroč. Pri penicilinu se nanj veže petčlenski tiazolidinski obroč. Skupno jedro vseh penicilinov je kemijsko nestabilna 6-amino-penicilanska kislina (6-APA), ki nastane s spojitvijo tiazolidinskega in betalaktamskega obroča. Na slednjega je s peptidno vezjo pripeta stranska veriga, ki določa glavne antibakterijske in farmakološke značilnosti vsakega posameznega penicilina. Osnovna kemijska zgradba penicilina je prikazana na Sliki 4.

Penicilin je šibka organska kislina, netopna v vodi. Z razcepitvijo betalaktamskega obroča nastaja penicilinska kislina, ki nima več antibakterijske aktivnosti.

Fizikalno-kemijske lastnosti penicilina se lahko spreminjajo z zamenjavo vodika v karboksilni skupini. Z zamenjavo vodika s kalijem ali natrijem nastajajo dobro topne soli penicilina, ki so v suhem stanju stabilne, raztopine pa so zelo nestabilne.

Zaradi prisotnosti štiričlenskega obroča so penicilinski antibiotiki izredno termolabilni in v kislem mediju nagnjeni k izomerizaciji. Antibiotik penicilin je v obliki proste kisline zelo slabo topen.



Slika 4: Osnovna kemijska zgradba penicilinov (Joshi S., 2001: 796)

2.3.2 Mobilnost, akumulacija, obstojnost in razgradnja

Betalaktamska zgradba prispeva k slabi stabilnosti penicilinov v okolju, zato običajno niso prisotni v vzorcih tal ali vode (Kemper, 2007). Vzrok sta lahko beta laktamaza, razširjen encim v bakterijah ali kemična hidroliza, ki razpreta betalaktamski obroč (Myllyniemi et al., 2000).

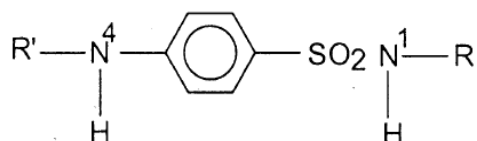
2.4 Sulfonamidi

Sulfonamidi se danes pogosto uporabljajo v živalih v terapevtske in profilaktične namene. So sintetični antibiotiki, ki delujejo bakteriostatično. Pogosto jih je potrebno kombinirati z drugimi antibiotičnimi pripravki, najpogosteje s trimetoprinom, saj je večina bakterij na njih že odporna. Sulfonamidi se dobro resorbirajo iz prebavil. 73-85 % sulfonamidov se izloči skozi ledvice, tudi do 85 % pa se jih izloči v aktivni obliki (Marolt-Gomišček, 1992; Haller et al., 2001). Za sulfonamide je značilno, da se izločajo z različnimi mehanizmi in različno hitro. Čas, ki je potreben za izločanje iz telesa, odloča o razvrstitvi sulfonamidov med kratko, srednje ali dolgo delujoče.

2.4.1 Kemične lastnosti

Po kemični zgradbi so podobni p-aminobenzojski kislini (PABA). Pridobivamo jih iz sulfanilamida (p-aminobenzensulfonamid). Večina terapevtsko aktivnih derivatov je ponavadi substituiranih na prvem dušiku (N1), četrty dušik (N4) pa je večinoma nesubstituiran. Osnovna kemična zgradba sulfonamidov je prikazana na Sliki 5.

Topnost sulfonamidov je odvisna od substituenta na prvem dušiku (N1). So amfoterni in tvorijo soli z močnimi kislinami.



Slika 5: Osnovna kemijska zgradba sulfonamidov (Joshi S., 2002: 805)

2.4.2 Mobilnost, akumulacija, obstojnost in razgradnja

Sorpcija antibiotikov v tleh je lahko posledica več mehanizmov, kot so elektrostatične interakcije, kompleksacija in hidrofobne razcepitve. Med temi sta kationska izmenjava (npr. z glinenimi minerali) in površinska kompleksacija (npr. s fenolnimi in karboksilnimi skupinami, N-heterocilkičnimi strukturami in ligninskimi razkrojnimi produkti) prevladujoča sorpcijska mehanizma v tleh pri sulfonamidni skupini (Gao in Pedersen, 2010). Sulfonamidi kažejo nizko sorpcijo v tleh, kar posledično pomeni, da imajo velik potencial za izpiranje.

Sulfonamidi se lahko močno adsorbirajo v iztrebkih, ki so bogati z organsko snovjo (Marengo et al., 1997). Tudi s prezračevanjem (aeracijo) in povišanjem temperature se te substance ne pretvorijo, kar lahko pomeni, da v okolje preidejo v povsem nespremenjeni obliki (Winckler in Grafe, 2001).

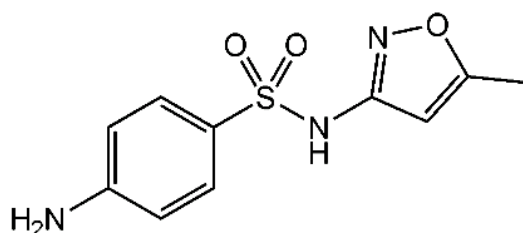
Nekatere raziskave kažejo, da imajo šibke kisline, kakršne so sulfonamidi, visok potencial za prenos v vodna telesa (Boxell et al., 2002; Kay et al., 2004). Za sulfonamide je značilno, da se v tleh hitro razgradijo.

2.4.3 Sulfametoksazol

Sulfametoksazol je eden glavnih predstavnikov skupine sulfonamidov. Deluje tako, da zavira normalno bakterijsko uporabo 4-aminobenzojske kisline, ki je potreba za sintezo folne kisline, zato ga prištevamo med antibiotike z bakteriostatičnim delovanjem. Njegova uporaba se je zaradi razvoja bakterijske odpornosti močno omejila, danes ga uporabljamo predvsem v kombinaciji s trimetoprinom.

Za sulfametoksazol je, v primerjavi s ciprofloksacinom, značilna veliko višja mobilnost v tleh, saj ima slabo afiniteto do tal.

Kemijska zgradba sulfametoksazola je prikazana na Sliki 6.



Slika 6: Kemijska zgradba sulfametoksazola (Gao et al., 2011: 31)

V Tabeli 1 so prikazane osnovne fizikalno-kemijske lastnosti sulfametoksazola (Vir: SCR PhysProp Database: Sulfamethoxazole, 2013).

Tabela 1: Fizikalno-kemijske lastnosti sulfametoksazola

Splošno ime	Sulfametoksazol
Polno ime (IUPAC)	4-amino-N-(5-metil-1,2-oksazol-3-il)benzensulfonamid
Molekularna formula	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S
Molekulska masa (g/mol)	253,28
Barva	Bela
Agregatno stanje	Trdno (kristali ali prah)
Tališče (°C)	166-169
Gostota (g/mL)	1,462
Topnost v vodi (mg/L; 37 °C)	610

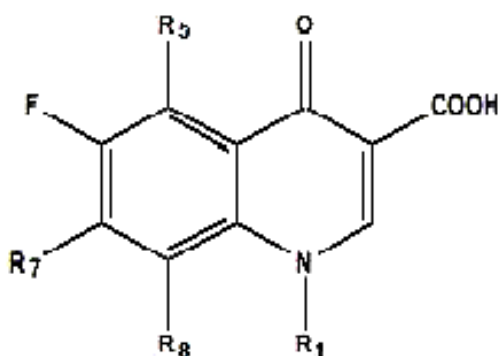
2.5 Fluorokinoloni

Fluorokinoloni so novejši antibiotiki, ki delujejo kot inhibitorji DNA gize, torej baktericidno, in imajo širok spekter delovanja. So piperazinil derivati nalidiksne kisline. Fluorokinolon je po lastnostih podoben aminokislinam. V veterinarski medicini fluorokinolone uporabljajo terapevtsko, profilaktično in kot rastne pospeševalce. Ta skupina antibiotikov je ena najmočnejših in najučinkovitejših skupin v boju proti Gram-negativnim bakterijam. Z razvojem novih spojin pa postajajo učinkoviti tudi proti Gram-pozitivnim bakterijam.

Tako za kinolone kot za fluorokinolone velja, da se v organizmu presnovijo le delno, v glavnem se izločijo v nespremenjeni aktivni obliki s sečem. Nekateri se tudi presnovijo kot na primer enrofloksacin, ki se skoraj popolno presnovi v drug kinolon, ciprofloksacin.

2.5.1 Kemične lastnosti

Fluorokinoloni izvirajo iz kinolonov in so sintetični antibiotiki, na katere je s kemijsko reakcijo dodan fluorid. Kemijsko so podobni nalidiksni kislini, s katero si delijo enak način delovanja. Splošna zgradba kinolonov je sestavljena iz 1-substituiranega-1,4-dihidro-4-oksopiridin-3-karboksilnega dela v kombinaciji z aromatskim ali heteroaromatskim obročem. Tudi za fluorokinolone je značilno, da lahko tvorijo stabilne komplekse s številnimi dvovalentnimi in trivalentnimi kovinskimi ioni. Osnovna kemijska zgradba fluorokinolonov je prikazana na Sliki 7.



Slika 7: Osnovna kemijska zgradba fluorokinolonov (Carlucci, 1998: 344)

2.5.2 Mobilnost, akumulacija, obstojnost in razgradnja

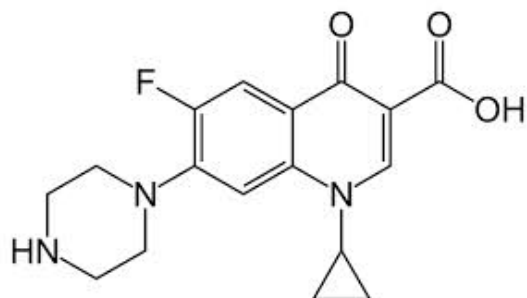
Sorpcija fluorokinolonov v tleh je večinoma posledica mehanizmov, kot so elektrostatične interakcije (npr. kationskega aminskega dela na fluorokinolonski molekuli na negativno nabit delec tal), kationske izmenjave (npr. izmenjava kationov na glinenih mineralih) in površinske kompleksacije (npr. vezava fluorokinolonske karboksilne skupine na kovinske okside in aluminosilikate) (Vasudevan et al., 2009). Fluorokinoloni kažejo visoko sorpcijo v tleh, lahko pa se kopičijo tudi v druge trdne komponente, kot je na primer blato iz čistilnih naprav in rečni sedimenti. Za fluorokinolone je značilno, da se v tleh zelo počasi razgradijo.

2.5.3 Ciprofloksacin

Ciprofloksacin spada v drugo generacijo kinolonskih učinkovin in je eden od najmočnejših antibiotikov proti gram-negativnim bakterijam. Ciprofloksacin je glavni metabolit enrofloksacina, široko uporabljenega veterinarskega antibiotika.

Ciprofloksacin velja za slabo mobilnega in ima visoko afiniteto do tal. Ker se v tleh močno veže, ne predstavlja velike nevarnosti za onesnaženje površinskih ali podzemnih voda. Vendar pa je ta antibiotik težko razgradljiv, zato lahko njegovo kopičenje v tleh predstavlja veliko okoljsko tveganje.

Kemijska zgradba ciprofloksacina je prikazana na Sliki 8.



Slika 8: Kemijska zgradba ciprofloksacina (Gao et al., 2011: 31)

V Tabeli 2 so prikazane nekatere fizikalno-kemijske lastnosti ciprofloksacina (Vir: SCR PhysProp Database: Ciprofloxacin, 2013).

Tabela 2: Fizikalno-kemijske lastnosti ciprofloksacina

Splošno ime	Ciprofloksacin
Polno ime (IUPAC)	1-ciklopropil-6-fluoro-4-okso-7-(piperazin-1-il)-kinolon-3-karboksilna kislina
Molekularna formula	$C_{17}H_{18}FN_3O_3$
Molekulska masa (g/mol)	331,35
Barva	Bela ali blede rumena
Agregatno stanje	Trdno (kristali ali prah)
Tališče (°C)	255-257
Gostota (g/mL)	/
Topnost v vodi (mg/L; 20 °C)	3000

2.6 Analitske metode

Zgradbe posameznih antibiotikov so različne, predstavniki vsake skupine pa so si zelo podobni. Zaradi njihovega izvora in nestabilnosti so lahko majhne količine strukturno podobnih spojin in njihovi razgradni produkti prisotni skupaj in jih je zato težko določiti in analizirati.

Intenziven razvoj in preučevanje analiznih tehnik, ki bi lahko omogočale hkratno določanje in identifikacijo večkomponentnih mešanic z zelo nizkimi koncentracijami antibiotikov in njihovih razgradnih produktov, poteka šele zadnje desetletje.

Najprimernejše metode kvantitativne analize za določanje protimikrobnih spojin so različne kromatografske metode, med katerimi je posebno učinkovita visokotlačna tekočinska kromatografija (HPLC), s katero lahko hitro in specifično določimo antibiotik tudi v prisotnosti primesi ali razgradnih produktov. Hkrati pa lahko služi tudi za njihovo izolacijo in čiščenje. Glavni vrsti detektorjev za HPLC sta detektor na diodno vrsto (DAD) in fluorescenčni detektor (FLD) (Oka et al., 2000; Hamscher et al., 2002).

GC-MS je plinska kromatografija z masnim spektrometrom, s katerim lahko določamo razgradne produkte. Za GC-MS analizo je potrebna predhodna ekstrakcija vzorcev.

Ekstrakcija antibiotikov iz trdnega ali tekočega vzorca je eden najtežjih korakov v celotnem procesu analize, predvsem zaradi izjemno nizkih koncentracij razgradnih produktov (Berrada et al., 2007; Tsai et al., 2009). V literaturi lahko zasledimo uporabo tekoče ekstrakcije, vodne ekstrakcije s pomočjo EDTA-McIlvain pufrom ali s prisotnostjo EDTA in citronske kisline (postopek se je izkazal za zelo uporabnega pri ekstrakciji tetraciklinov). Kot učinkovita ekstrakcijska tehnika se je izkazala tudi uporaba mešanice voda/metanol. Ena najbolj priljubljenih ekstrakcijskih metod v zadnjem času pa je metoda ekstrakcije na trdni fazi (SPE – solid phase extraction), ki je hitra, zanesljiva in enostavna (Boyd et al., 2007).

3 EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 Reagenti in raztopine

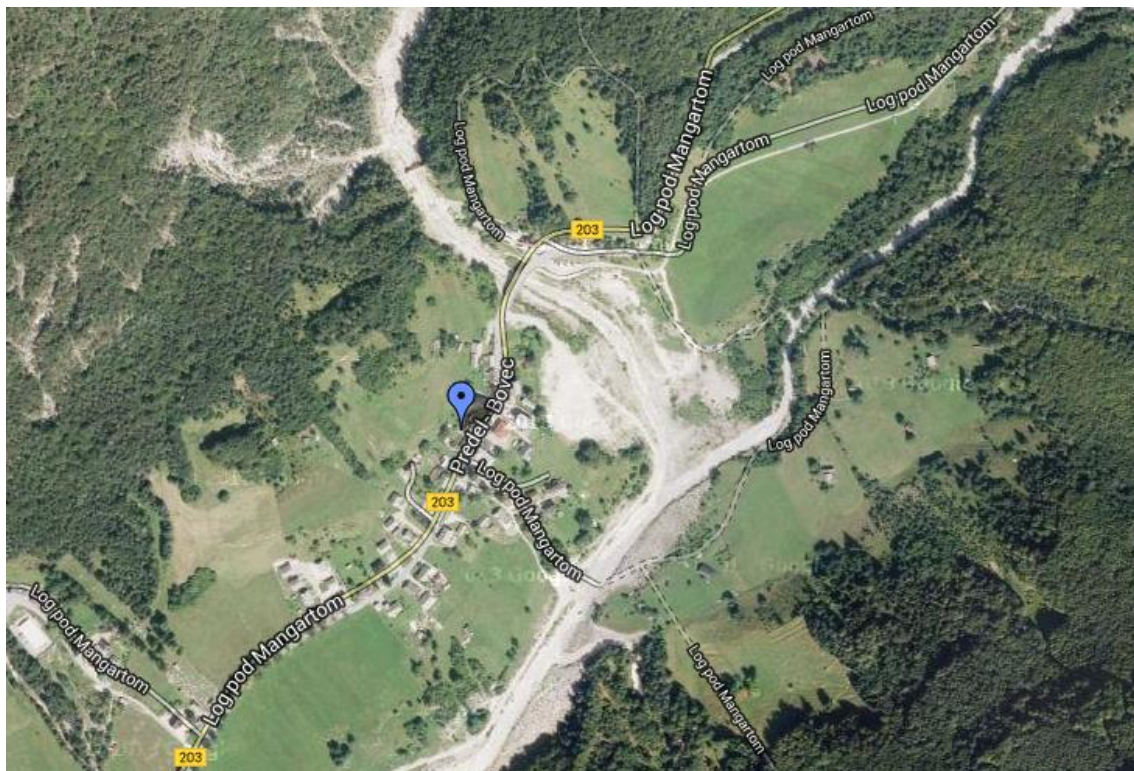
- 2x deionizirana voda, NANO PURE, ultrapure water system (Barnstead)
- raztopina metanojske kisline (~0,1 %): v stekleno posodo za mobilno fazo sem dala 2,5 mL metanojske kisline (98 %, SIGMA-ALDRICH) in 2,5 L dvakrat deionizirane vode
- acetonitril za HPLC >99,9 % (SIGMA-ALDRICH)
- ciprofloksacin hidroklorid, čistost 99,54 % (MOLEKULA)
- sulfametoksazol (SIGMA-ALDRICH)

3.2 Pripomočki in aparature

- tehtnica EMB, max = 1200 g (d = 0,1 g) (KERN)
- tehtnica ABS, max = 120 g (e = 1 mg), min = 10 mg (d = 0,1 mg) (KERN)
- sušilnik (WTC)
- tekočinski kromatograf visoke ločljivosti HPLC (Aligent 1100) opremljen z detektorjem z diodno matriko DAD, fluorescenčnim detektorjem FLD in avtomatskim vzorčevalnikom
- kromatografska kolona LUNA 3 μ C18, 150 x 4,6 mm
- ultrazvočna kopel (SONIS)
- injekcije 10 mL
- filtri za enkratno uporabo, PTFE membrana, 0,45 μ m (SIGMA-ALDRICH)
- pH meter (HANNA instruments HI 8417)
- UV-Vis spektrofotometer z integracijsko sfero (Perkin Elmer Lambda 650S)

3.3 Odvzem vzorcev tal

Slika 9 prikazuje mesto vzorčenja tal, ki se nahaja v vasi Log pod Mangartom (v nadaljevanju vzorčevalno mesto 1). Vzorci tal so bili odvzeti na obdelani površini v rastlinjaku. Vzorce tal sem odvzela dne 5.5.2013 in 12.5.2013. Vzorce so bili odvzeti približno 10 cm pod površino, na izbrani površini vzorčnega mesta sem odvzela dvakrat po 9 kg vzorcev tal.



Slika 9: Zračni posnetek vasi Log pod Mangartom z označenim mestom odvzema vzorcev tal (Vir: <http://maps.google.com/>)

Slika 10 prikazuje mesto vzorčenja tal, ki se nahaja v kraju Šempeter pri Gorici (v nadaljevanju vzorčevalno mesto 2). Vzorce tal so bili odvzeti iz enega od rastlinjakov Biotehniške šole. Vzorce tal sem odvzela dne 8.5.2013 in 13.5.2013. Dvakrat po 9 kg vzorcev tal sem odvzela približno 10 cm pod površino.



Slika 10: Zračni posnetek kraja Šempeter pri Gorici z označenim mestom odvzema vzorcev tal (Vir: <http://maps.google.com/>)

3.4 Priprava vzorcev tal za analizo

3.4.1 Sušenje vzorcev tal in določanje vlage

Po odvzemu vzorcev tal na vzorčevalnih mestih sem vzorce pripeljala v prostore Laboratorija za raziskave v okolju v Rožni Dolini, kjer smo vzorce shranili in jih pripravili za analizo. Vzorce tal sem najprej razdelila v posodice iz aluminijaste folije, zatem sem vzorce natančno stehtala. Nato sem vzorce sušila v sušilniku na temperaturi 105 °C. Vsakih 60 minut sem preverila maso vzorcev, dokler masa ni bila stalna. Nato sem vzorce ohladila, še enkrat natančno stehtala in shranila v zato pripravljene PVC posode. Vzorcem tal smo iz rezultatov meritev določili tudi odstotek vlage, ki nam je omogočil izračun specifične gostote polnitve v koloni. Vse izračunane vrednosti so predstavljene v poglavju z rezultati.

3.5 Priprava kolon

Kolone smo izdelali iz polipropilenskih kanalizijskih cevi, ki jih uporabljajo za odvajanje gospodinjstskih in fekalnih odplak ter meteorne vode v zgradbah. Cevi dolžine 50 cm in premera 110 mm, z notranjim premerom 104 mm smo najprej temeljito oprali. Na konec vsake cevi smo dali reducirni kos za cev in ga s cevjo spojili s pomočjo drsne spojke. Vse dele smo na koncu povezali še s silikonom. V odprtino reducirnega kosa smo dali gumijast zamašek, v katerega smo z plutovrtom naredili luknjo. Tudi zamašek smo tako iz zunanje kot iz notranje strani pritrdili s silikonom. V izvrtano luknjo v plutastem zamašku smo najprej dali konico za avtomatsko pipeto (5 mL), nato pa smo nanjo nataknili plastično cev za vodo, premera 1 cm in dolžine 100 cm. Na koncu smo vseh šest kolon pritrdili na železno stojalo. Sestavljene kolone so prikazane na Sliki 11.



Slika 11: Sestavljene kolone iz polipropilenskih kanalizijskih cevi

3.6 Polnjenje kolon

Na dno pripravljene kolone sem najprej položila fino alkalno obstojno mrežico iz steklenih vlaken, ki jo uporabljajo pri izdelavi fasad. Nanjo sem vsula najprej pesek velikosti manjše od 1 mm, nato pa še pesek velikosti večje od 2 mm. Na nasut pesek sem nato dala še grobo mrežico.

Vsako kolono posebej smo nato napolnili z znano količino posušene zemlje. V vsako kolono smo dali 4,75 kg zemlje, tako da je zemlja v kolonah segala do višine 40 cm.

Tri kolone so vsebovale en tip tal, s tem da je bila ena od kolon kontrolna in vanjo nismo dodali raztopine z antibiotiki. Kolone napolnjene z dvema različnima tipoma tal so prikazane na Sliki 12.



Slika 12: Kolone napolnjene z dvema različnima tipoma tal

3.6.1 Gostota vzorcev tal in mrtvi volumen kolon

Za potrebo izračuna gostote in mrtvega volumna vzorcev tal iz vzorčevalnega mesta 1 in 2 sem vzela približno 100 g vsakega vzorca in ga čez noč sušila v peči pri temperaturi 105 °C. Posušene in stehtane vzorce tal (60 g) sem nato dala v 250 mL valj, v katerem je bilo 100 mL vode. Iz odčitane dviga volumna vode v merilnem valju sem izračunala gostoto vzorcev tal po enačbi $\rho = m_s/V_v$, pri čemer je m_s masa stehtanega vzorca tal po sušenju, V_v pa dvig volumna v merilnem valju.

Po enačbi $V = \pi \cdot r^2 \cdot h$, kjer je r notranji polmer kolone in znaša 5,2 cm, h pa predstavlja višino zemlje v koloni (40 cm), sem izračunala celotno prostornino polnitve v koloni (V). Iz dobljenega rezultata in izračunane prostornine dodane zemlje ($V_z = m/\rho$, kjer je m masa zemlje v koloni) sem nato lahko izračunala mrtvi volumen v kolonah z različnima tipoma tal. Mrtvi volumen predstavlja volumen medzrnskega prostora v koloni, kjer se voda lahko zadržuje. Po nanosu določenega volumna raztopine na kolono se iz nje v principu najprej izloči voda iz medzrnskega prostora (mrtvi volumen),

nanesena raztopina pa se na iztoku iz kolone pojavi šele po iztoku mrtvega volumna. Vsi izračuni so predstavljeni v poglavju z rezultati.

3.7 Izvedba poskusa

Najprej smo skozi plastične cevke, vsako kolono posebej, napolnili z vodo. Polnitev je potekala od dna proti vrhu, da smo iz tal potisnili zrak ujet med porami. V vsako kolono smo nalili približno 3,2 L navadne vode. Ko so bila tla na vrhu mokra, smo prenehali z zalivanjem. Plastične cevke smo s trakom prilepili na zunanjo steno kolon in vanje nalili vodo, da smo v kolonah lahko vzdrževali stalne hidrostatične pogoje in poskrbeli, da se tla v kolonah čez noč niso posušila. Vsako kolono posebej smo dvakrat sprali z 0,5 L vode. Naslednji dan smo v kolone dodali raztopine z antibiotiki.

Na podlagi izračunov smo se odločili, da bomo v vsako kolono dali 0,5 L vode, ki vsebuje 100 mg (koncentracija 200 mg/L) sulfametoksazola in 40 mg (koncentracija 80 mg/L) ciprofloksacina. Vsak dan za tem smo v vsako kolono dodali 0,5 L deionizirane vode brez antibiotikov.

Vzorčenje je potekalo tako, da smo vsak vzorčevalni dan iz vsake kolone pobrali pet vzorcev izcedne vode s prostornino 100 mL. Vzorce smo nato prefiltrirali in pripravili za analizo HPLC. Da smo zmanjšali število vzorcev za analizo, smo vzorce vzporednih frakcij izcedne vode iz kolon z istim tipom tal in z dodanima antibiotikoma združili in tako analizirali le povprečne vzorce. Vzorčenje je potekalo devet dni, od 26. 6. 2013 do 5. 7. 2013. Potek vzorčenja je prikazan na Sliki 13.



Slika 13: Potek zbiranja vzorcev v 100 mL merilne valje

3.7.1 Določanje pH vzorcev izcednih vod

Po kalibraciji pH-metra (s tamponskima raztopinama pH 4.0 in 7.0) sem pri sobni temperaturi 26 °C izmerila pH v 100 mL vsakega od izbranih vzorcev. Od vsake kolone sem izmerila tri različne vzorce, in sicer iz prvega, četrtega in devetega vzorčevalnega dne. Rezultati meritev so predstavljeni v poglavju z rezultati.

3.8 Analiza vzorcev na kromatografu HPLC

3.8.1 Kromatografski pogoji za HPLC

V Tabeli 3 so navedeni kromatografski pogoji za HPLC, ki smo jih uporabili za določanje koncentracij sulfametoksazola in ciprofloksacina v tleh.

Tabela 3: Kromatografski pogoji za HPLC

KROMATOGRAF	Hewlet Packard 1100
KOLONA	Luna 3 μ C18(2) 150 x 4,6 mm
DETEKTOR	DAD: 270 nm FLD: exc = 280 nm, em = 450 nm
PRETOK	0,800 mL/min
VOLUMEN INJICIRANJA	50,00 μ L
MOBILNA FAZA	A = metanojska kislina (0,1 %) v 2x deionizirani vodi B = acetonitril
ELUCIJA	Gradientna Acetonitril: 0min - 13,0 % 7min - 13,0 % 11min - 37,0 % 18min - 37,0 %
ČAS ANALIZE	18 min.
TEMPERATURA	26 °C

3.9 Ugotavljanje stabilnosti sulfametoksazola in ciprofloksacina

Stabilnost sulfametoksazola smo določili s pomočjo analize standardne raztopine s koncentracijo 10 mg/L na UV-Vis spektrofotometru, stabilnost ciprofloksacina pa z analizo standardne raztopine s koncentracijo 5 mg/L. Raztopinam standardov smo vsakih 24 ur izmerili absorpcijski spekter in iz spreminjanja absorbance pri valovni dolžini absorpcijskega maksimuma ocenili stabilnost antibiotika. Rezultati meritev so predstavljeni v poglavju z rezultati.

4 REZULTATI IN DISKUSIJA

4.1 Določitev vlage v vzorcih tal

V Tabelah 4 in 5 so podani rezultati meritev vlage v vzorcih tal iz dveh različnih vzorčevalnih mest, ki smo jo določili s pomočjo sušenja in tehtanja. Iz rezultatov je razvidno, da se je vlažnost tal med posameznimi meritvami spreminjala. Za to je lahko razlog dvakratni odvzem vzorcev tal na posameznem vzorčevalnem mestu v razmiku enega tedna zaradi premajhne odvzete količine ob prvem vzorčenju in tudi čas med posameznimi dolgotrajnimi meritvami, ko so vzorci tal lahko izgubili vlago. Ugotovljena povprečna vlažnost tal iz vzorčevalnega mesta 1 (Log pod Mangartom) je bila med 6,2 in 16,0 %, pri vzorcih tal iz vzorčevalnega mesta 2 (Šempeter pri Gorici) pa je bila med 3,0 in 6,4 %. V primeru vzorčevalnega mesta 2 so tako vsebnost vlage kot tudi razlike med vzorci manjše, saj tla v rastlinjaku niso bila izpostavljena padavinam, zaradi nizke vsebnosti vlage pa je bila tudi njena izguba po vzorčenju nižja. Razlike z vidika rezultatov niso pomembne, saj smo podatek o vlažnosti potrebovali le za zagotovitev primerne in čimbolj podobne polnitve vseh kolon (1,2-1,4 kg/L).

Tabela 4: Določanje vlage v vzorcih tal iz vzorčevalnega mesta 1

DATUM MERITEV	MASA ZATEHTANEGA VZORCA (g)	MASA PO SUŠENJU (g)	VLAGA (%)	POVPREČJE (%)	S.D. (%)
6. 5. 2013	1017,8	880,1	13,8	16,0	1,5
	1055,8	883,8	17,2		
	1007,1	844,3	16,3		
	1008,2	841,8	16,6		
8. 5. 2013	1006,4	934,5	7,2	7,4	0,6
	1008,0	941,1	6,7		
	1006,4	931,4	7,5		
	1004,8	922,7	8,2		
	683,5	611,6	7,2		
13. 5. 2013	1012,1	888,4	12,4	12,3	0,9
	1015,2	880,4	13,5		
	1006,4	892,3	11,4		
	1009,5	892,3	11,7		
15. 5. 2013	1009,4	950,0	5,9	6,2	0,5
	1005,2	937,9	6,7		
	1005,0	940,2	6,5		
	1007,4	951,7	5,6		

Tabela 5: Določanje vlage v vzorcih tal iz vzorčevalnega mesta 2

DATUM MERITEV	MASA ZATEHTANEGA VZORCA (g)	MASA PO SUŠENJU (g)	VLAGA (%)	POVPREČJE (%)	S.D. (%)
9. 5. 2013	1000,5	961,5	3,9	3,8	0,1
	1016,2	979,3	3,7		
	1005,4	966,4	3,9		
10. 5. 2013	1010,9	973,3	3,8	3,4	0,3
	1013,3	979,8	3,4		
	1012,8	982,0	3,1		
	1008,5	974,1	3,4		
13. 5. 2013	1040,8	977,1	6,4	6,4	0,2
	1081,7	1015,5	6,6		
	1084,6	1020,9	6,4		
	1068,8	1007,0	6,2		
14. 5. 2013	1015,8	963,7	5,2	4,9	0,4
	1011,6	965,3	4,6		
15. 5. 2013	1000,6	971,8	2,9	3,0	0,4
	1016,4	989,4	2,7		
	1024,8	989,9	3,5		
	1023,2	995,4	2,8		

4.2 Gostota vzorcev tal in mrtvi volumen kolon

Rezultati meritev gostote vzorcev tal (Tabela 6) kažejo na manjšo razliko v gostoti med vzorcema tal s posameznih vzorčevalnih mest. To pripisujemo razliki v strukturi tal, saj smo pri vzorcih tal iz vzorčevalnega mesta 2 opazili večjo vsebnost drobnega kamenja. Iz razlike v gostoti izhajata tudi razliki v mrtvem volumnu posameznih kolon (Tabela 7), kljub enaki gostoti polnitve kolon (1,4 kg/L).

Tabela 6: Gostota vzorcev tal iz vzorčevalnih mest 1 in 2

VZOREC	MASA VZORCA (kg)	DVIG VOLUMNA (L)	GOSTOTA VZORCA (kg/L)
TIP TAL 1	0,060	0,028	2,140
TIP TAL 2	0,060	0,025	2,396

Tabela 7: Mrtvi volumen kolon z vzorci tal iz vzorčevalnih mest 1 in 2

VZOREC	SKUPNI VOLUMEN KOLONE (L)	VOLUMEN VZORCA TAL (L)	MRTVI VOLUMEN (L)
TIP TAL 1	3,396	2,220	1,176
TIP TAL 2		1,982	1,414

4.3 Meritve pH vzorcev

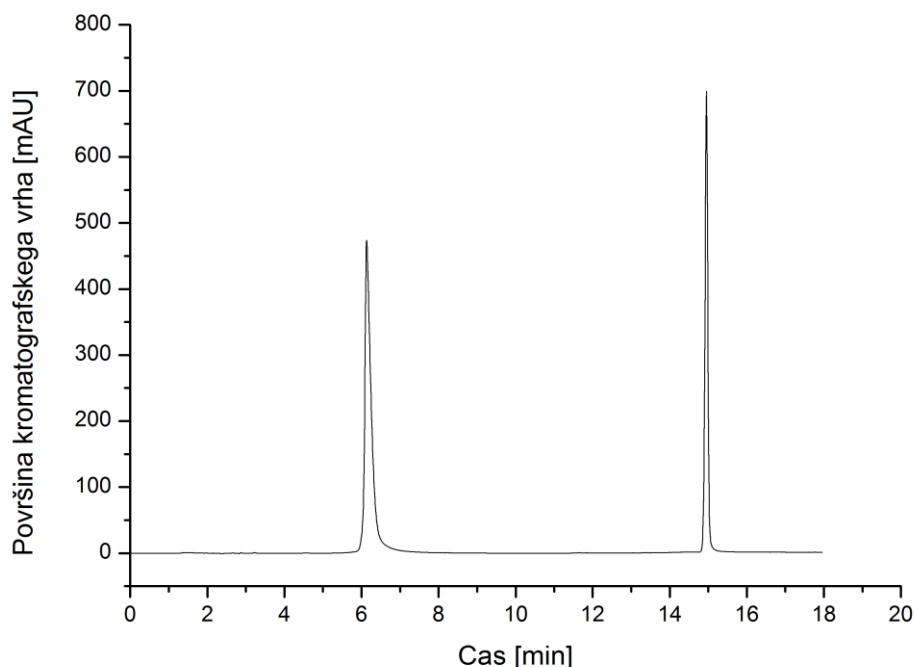
V Tabeli 8 so predstavljeni rezultati meritev pH vzorcev izcedne vode. Iz meritev pH je razvidno, da so izcedne vode rahlo alkalne in da sta si vzorca tal iz dveh različnih vzorčevalnih mest po kislosti izcedne vode podobna.

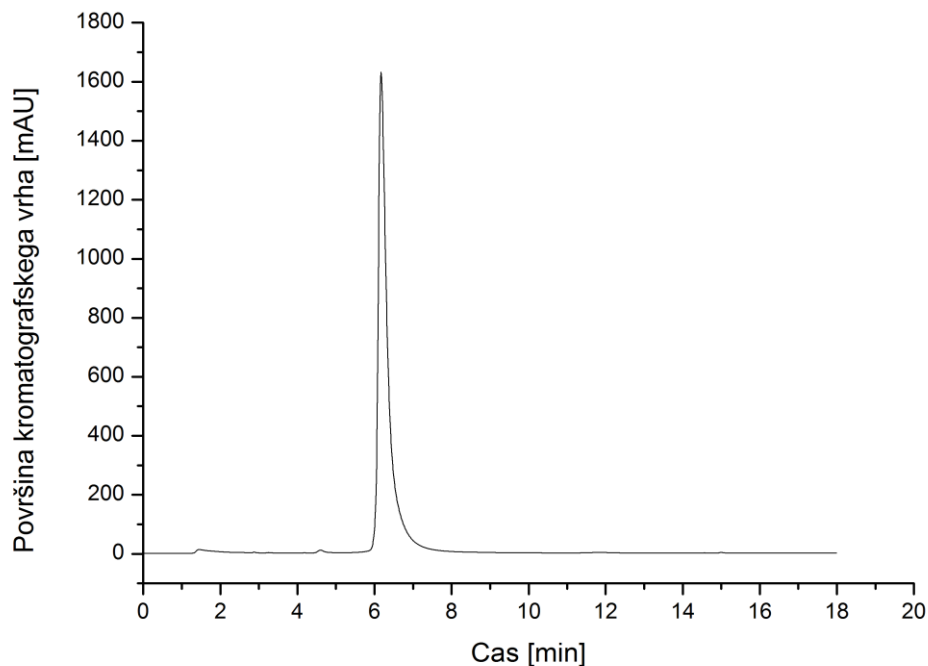
Tabela 8: Rezultati meritev pH vzorcev izcedne vode

VZOREC	26. 6. 2013	29. 6. 2013	5. 7. 2013
TIP TAL 1	7,75	7,18	7,39
TIP TAL 2	7,50	7,86	7,69

4.4 Določitev retencijskega časa sulfametoksazola in ciprofloksacina

Z analizo standardnih raztopin sulfametoksazola in ciprofloksacina s koncentracijo 50 mg/L na kromatografu HPLC smo dobili kromatograme s kromatografskima vrhovoma za vsebovana antibiotika. Za sulfametoksazol smo kromatografski vrh zaznali pri retencijskem času 14,9 minut, za ciprofloksacin pa pri retencijskem času 6,2 minut. Kateri antibiotik je sulfametoksazol in kateri ciprofloksacin smo ugotovili na podlagi dejstva, da sulfametoksazol ne fluorescira. Na Sliki 14 sta prikazana kromatograma standardnih raztopin obeh antibiotikov merjena z različnima detektorjema.



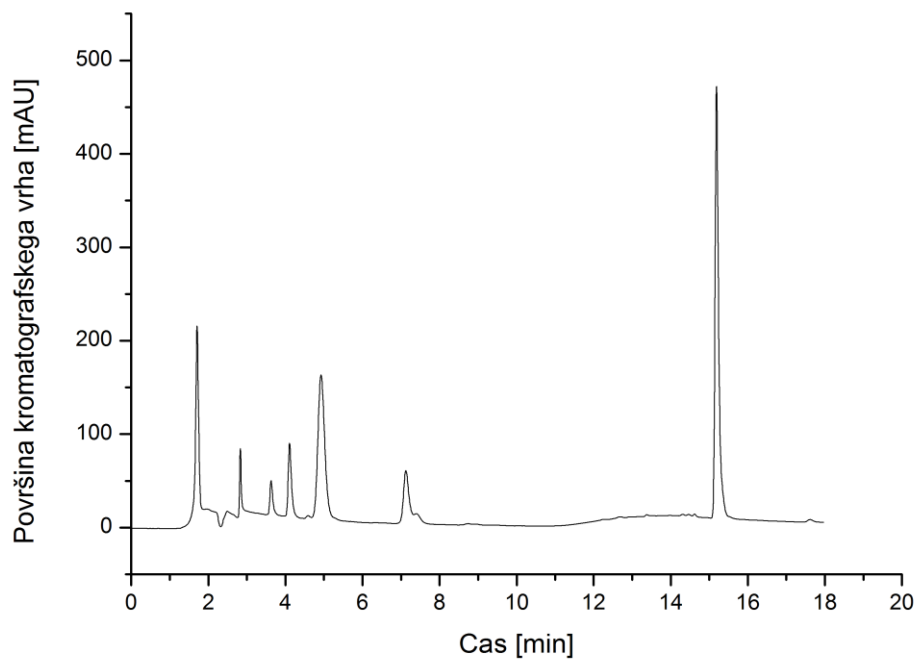


Slika 14: Kromatograma standardne raztopine sulfametoksazola in ciprofloksacina dobljena z DAD detektorjem (zgoraj) in FLD detektorjem (spodaj)

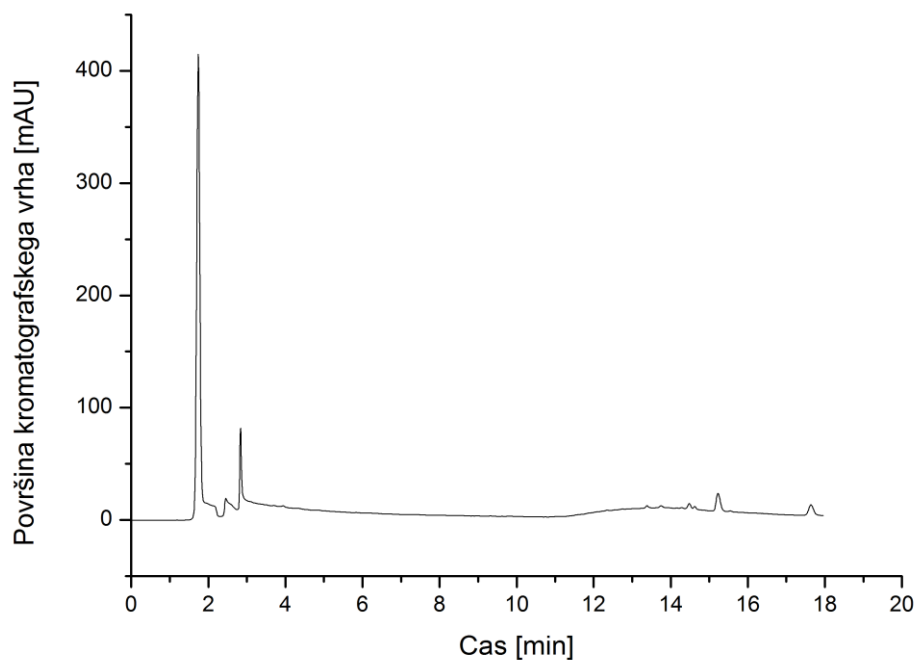
Na Sliki 15 je kromatogram realnega vzorca izcedne vode iz vzorca tal iz vzorčevalnega mesta 1, ki je bil odvzet dne 29. 6. 2013. Na kromatogramu je viden kromatografski vrh sulfametoksazola pri retencijskem času 14,9 minut, za katerega smo izračunali koncentracijo 5,90 mg/L.

Na Sliki 16 je predstavljen kromatogram izcedne vode iz kontrolne kolone napolnjene z vzorcem tal iz vzorčevalnega mesta 1, v kateri ni bilo dodanih antibiotikov.

Iz kromatogramov na Slikah 15 in 16 vidimo, da je ločba obeh antibiotikov od sestavin tal zadovoljiva in ne prihaja do interferenc. Kromatografske vrhove pri retencijskih časih med 3 in 8 minut (Slika 15) pripisujemo nečistočam v standardu sulfametoksazola.



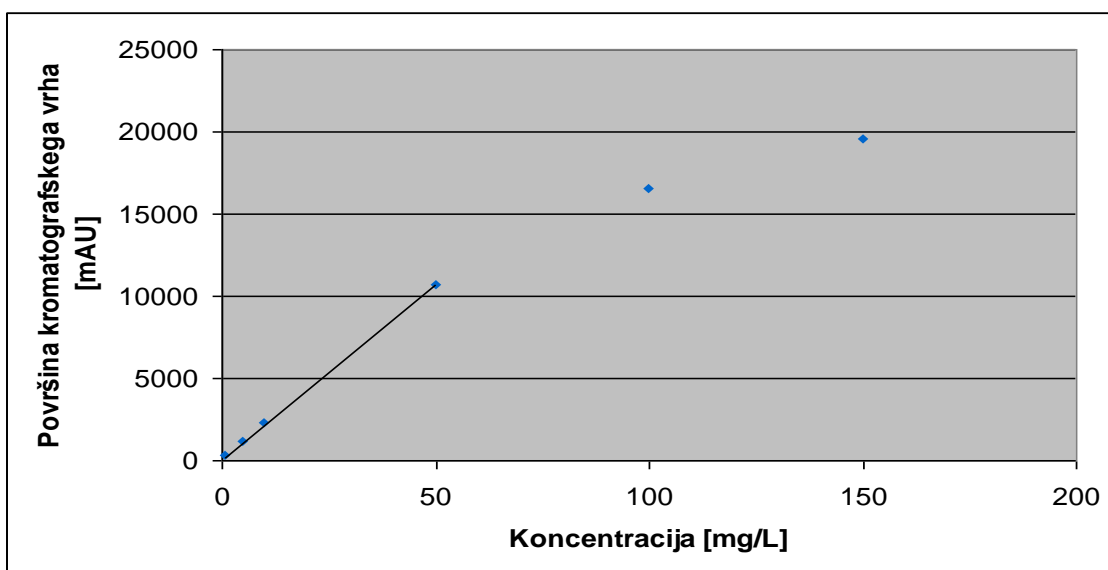
Slika 15: Kromatogram realnega vzorca (DAD detektor pri 270 nm)



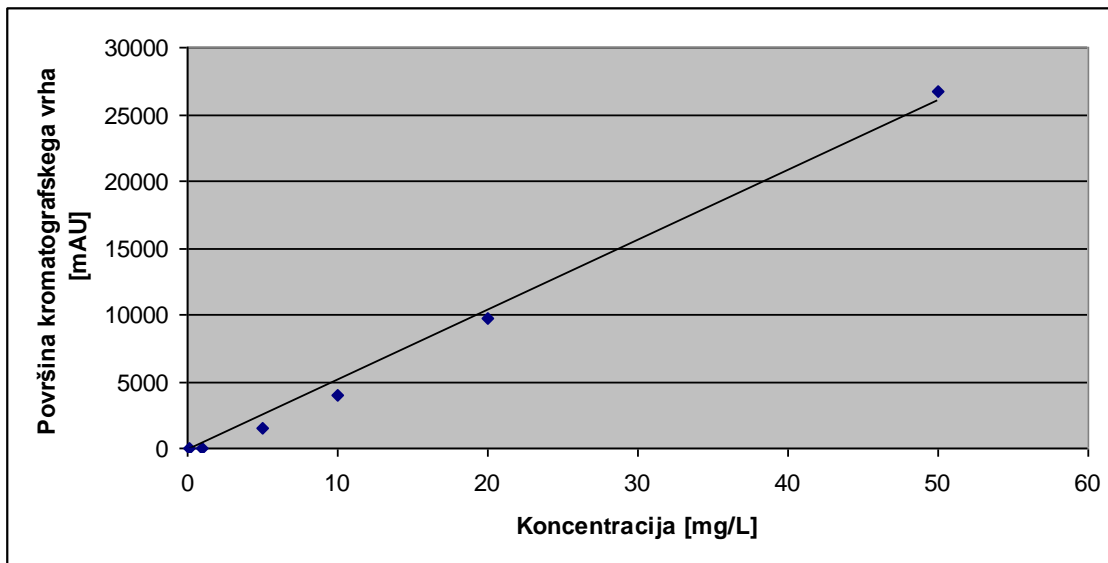
Slika 16: Kromatogram izcedne vode iz kontrolne kolone napolnjene z vzorcem tal iz vzorčevalnega mesta 1 (DAD detektor pri 270 nm)

4.5 Umeritvena premica za sulfametoksazol in ciprofloksacin

Za določevanje sulfametoksazola in ciprofloksacina v realnih vzorcih smo kromatograf HPLC umerili z raztopinami obeh antibiotikov z znanimi koncentracijami. Za ciprofloksacin smo pripravili standardne raztopine s koncentracijami 0,1, 1, 5, 10, 20 in 50 mg/L, za sulfametoksazol pa standardne raztopine s koncentracijami 1, 5, 10, 50, 100 in 150 mg/L ter jih analizirali na HPLC. Iz površin kromatografskih vrhov za oba antibiotika, v odvisnosti od koncentracije, smo z metodo linearne regresije izračunali enačbo umeritvene premice $A = kC + n$, kjer A predstavlja površino kromatografskega vrha, k naklon premice, C koncentracijo antibiotika, n pa odsek na ordinatni osi. Iz enačbe smo na podlagi izmerjenih površin kromatografskih vrhov izračunali neznane koncentracije antibiotikov v vzorcih izcedne vode. Enačba umeritvene premice za ciprofloksacin v območju koncentracij 0,1 in 50 mg/L je bila $y = 544,66 x - 808,41$ z determinacijskim koeficientom $R^2 = 0,9972$. Odvisnost površine kromatografskega vrha od koncentracije sulfametoksazola ni bila linearna zato smo neznane koncentracije v izcednih vodah za nizke koncentracije računali iz enačbe umeritvene premice za sulfametoksazol med koncentracijama 1 in 50 mg/L, ki je bila $y = 212,13 x + 82,235$ z determinacijskim koeficientom $R^2 = 0,9999$, za koncentracije med 50 in 100 mg/L pa po enačbi $y = 116,53 x + 4852,6$ z determinacijskim koeficientom $R^2 = 1$. Umeritvene premice za oba antibiotika so prikazane na Slikah 17 in 18.



Slika 17: Umeritvena premica za sulfametoksazol



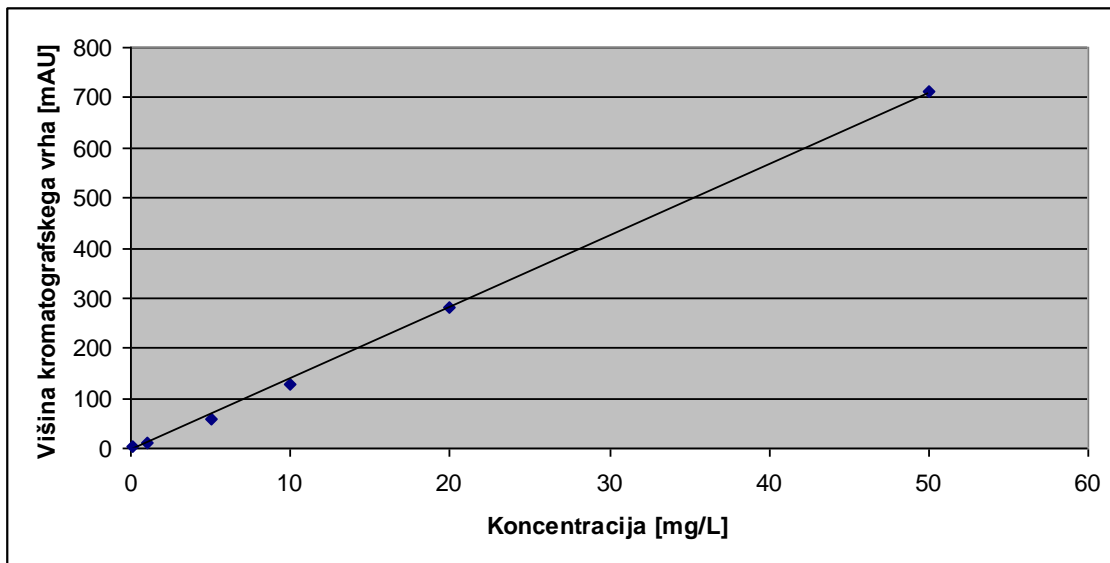
Slika 18: Umeritvena premica za ciprofloksacin

4.6 Določanje spodnje meje detekcije

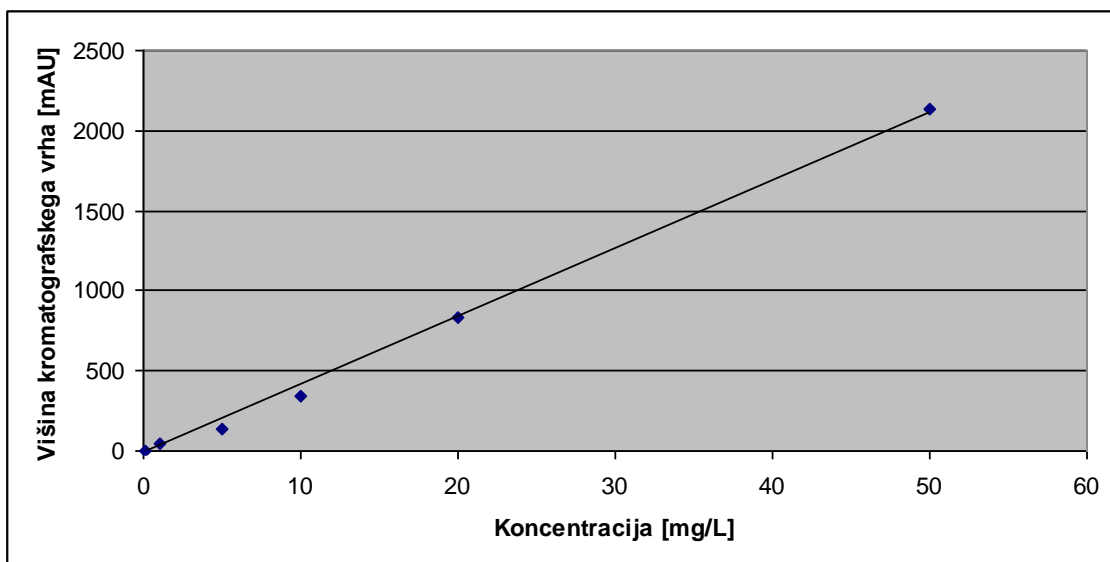
Spodnja meja detekcije (LOD - limit of detection) predstavlja najnižjo koncentracijo analita, ki jo še lahko zaznamo z izbrano analizno metodo. Pri tem še lahko razločimo kromatografski vrh od šuma ozadja in mu lahko določimo njegovo površino oziroma višino, iz česar lahko izračunamo koncentracije v vzorcih. Substanca je lahko pod mejo LOD še vedno prisotna, vendar je z našo izbrano analizno metodo ne moremo več zaznati.

Za določitev LOD sulfametoksazola in ciprofloksacina smo analizirali mešane standardne raztopine obeh antibiotikov z znanimi koncentracijami od 0,1 do 50 mg/L in izračunali enačbi umeritvenih premic. Za razliko od umeritvenih premic zgoraj smo za potrebe določanja LOD uporabili višine kromatografskih vrhov, zato da smo lahko določili standardni odklon signala bazne linije kromatograma pri retencijskem času obeh antibiotikov pri večkratnem injiciranju vzorcev frakcij izcedne vode iz kontrolne kolone. Za izračun LOD smo uporabili enačbo $LOD = 3SD/k$, pri čemer SD predstavlja standardni odklon signala bazne linije kromatogramov frakcij izcedne vode iz kontrolne kolone pri retencijskem času analita in k naklon premice. Umeritveni premici za določitev LOD za sulfametoksazol in ciprofloksacin sta prikazani na Sliki 19 in 20.

Izračunana vrednost LOD za sulfametoksazol znaša 0,08 mg/L, za ciprofloksacin pa 0,02 mg/L.



Slika 19: Umeritvena premica za določanje LOD za sulfametoksazol



Slika 20: Umeritvena premica za določanje LOD za ciprofloksacin

4.7 Analize vzorcev izcedne vode s HPLC

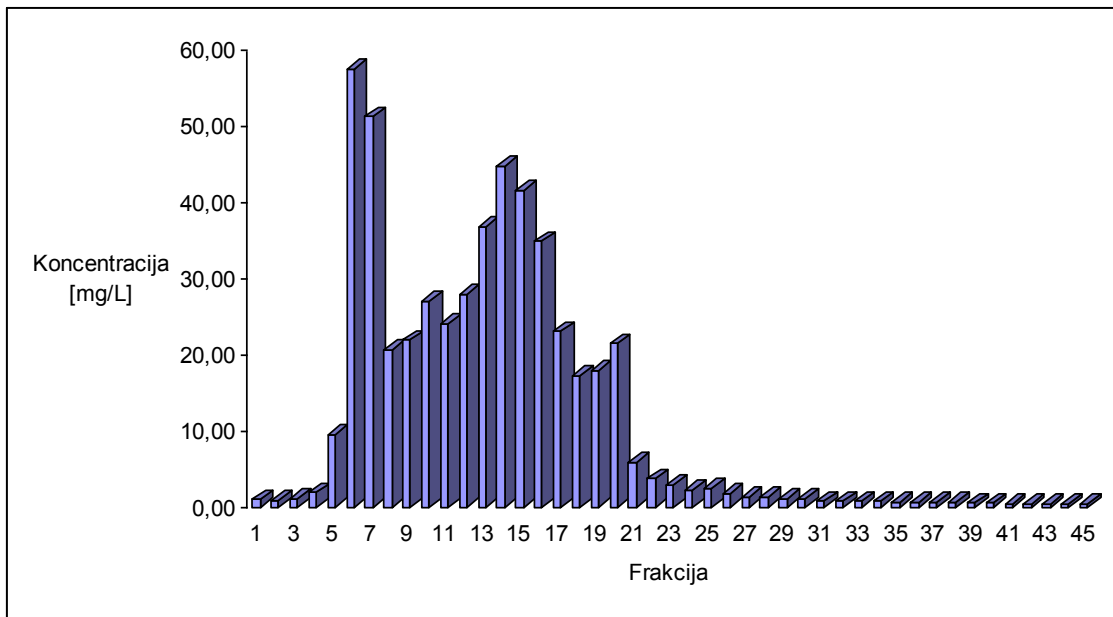
Analize vzorcev izcedne vode z metodo HPLC smo opravili po zgoraj opisani metodi (Tabela 3, str. 21). Rezultati analiz so pokazali, da se je iz kolon izločil le sulfametoksazol, ciprofloksacina pa nismo zaznali v nobenem od analiziranih vzorcev. Rezultati meritev stabilnosti obeh antibiotikov, so pokazali, da se njuna koncentracija v preiskovanih vzorcih v času poizkusa ni zmanjševala, zato odsotnosti ciprofloksacina v izcedni vodi ne moremo pripisati njegovemu razpadu, pač pa edino zadrževanju na koloni zaradi močne vezave v tleh.

Za vse analizirane vzorce smo izračunali koncentracijo sulfametoksazola po enačbi $C = A - n/k$, kjer C predstavlja koncentracijo izločenega antibiotika v merjeni frakciji, A površino kromatografskega vrha pri retencijskem času sulfametoksazola, n odsek na ordinatni osi ter k naklon umeritvene premice za sulfametoksazol. Ker smo precenili znižanje začetne koncentracije zaradi disperzije v koloni in smo na kolone nanесли zelo visoke količine sulfametoksazola, so bili kromatografski vrhovi v nekaterih vzorcih izven nižjega linearnega koncentracijskega območja umeritvene premice, zato smo za računanje koncentracij uporabili dva kriterija. V vzorcih, kjer je bila površina kromatografskega vrha manjša ali enaka 10600 mAU (površina kromatografskega vrha v standardni raztopini s koncentracijo 50 mg/L) smo uporabili naklon in odsek na ordinatni osi premice za koncentracije od 1 mg/L do 50 mg/L. Za površine kromatografskih vrhov večje od 10600 mAU smo uporabili naklon in odsek na ordinatni osi premice od koncentracije 50 mg/L do 100 mg/L, saj je umeritvena premica v celotnem koncentracijskem območju nelinearna. Iz dobljenih koncentracij smo nato preračunali mase izločenega sulfametoksazola ter masne deleže v posameznih frakcijah. Izračunane koncentracije in mase v posamezni frakciji za vzorce tal iz vzorčevalnega mesta 1 in 2 so prikazane v Tabelah 9 in 10.

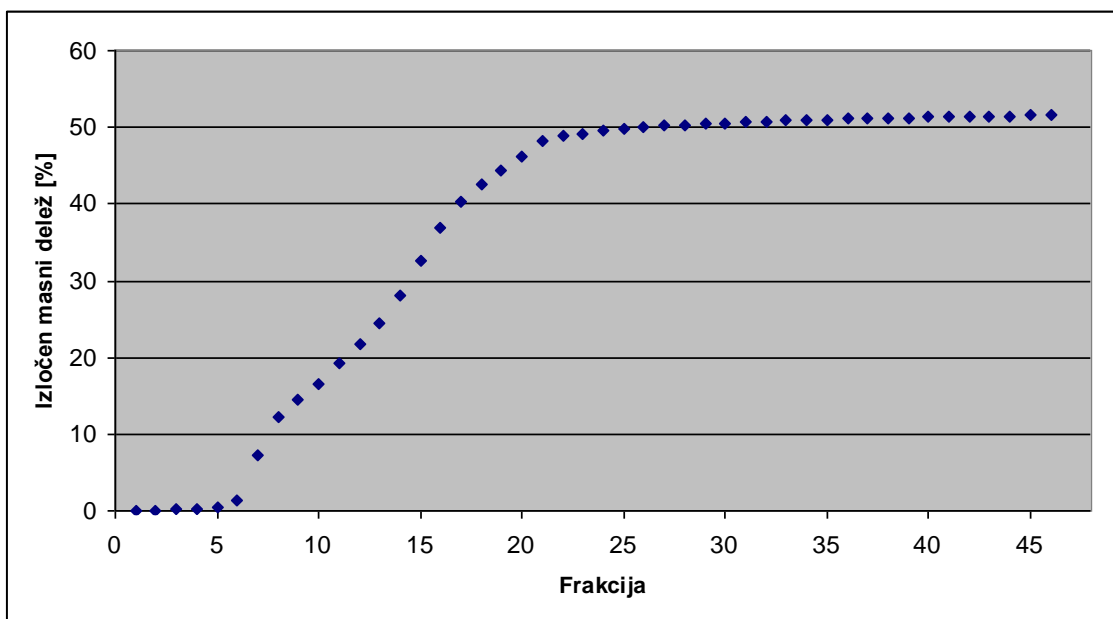
Na Sliki 21 je prikazano spreminjanje koncentracij sulfametoksazola v vzorcih izcedne vode po posameznih 100 mL frakcijah, na Sliki 22 pa iz njih izračunan delež celotne mase izločenega sulfametoksazola do posamezne frakcije za vzorce tal iz vzorčevalnega mesta 1. Sliki 23 in 24 prikazujeta rezultate za vzorce tal iz vzorčevalnega mesta 2.

Tabela 9: Analize vzorcev izcedne vode tal iz vzorčevalnega mesta 1

FRAKCIJA	POVPREČNA POVRŠINA KROMATOGRFSKEGA VRHA (mAU)	KONCENTRACIJA (mg/L)	MASA (mg)
1	105	1,00	0,10
2	102	0,95	0,10
3	112	1,05	0,11
4	241	1,95	0,20
5	1311	9,50	0,95
6	9751	57,45	5,75
7	8569	51,30	5,13
8	2894	20,65	2,07
9	3080	21,95	2,20
10	3914	27,05	2,71
11	3387	24,10	2,41
12	4078	27,90	2,79
13	5791	36,80	3,68
14	7319	44,80	4,48
15	6718	41,65	4,17
16	5417	34,85	3,49
17	3248	23,10	2,31
18	2416	17,25	1,73
19	2503	17,90	1,79
20	3016	21,50	2,15
21	804	5,90	0,59
22	487	3,70	0,37
23	390	3,00	0,30
24	275	2,20	0,22
25	321	2,50	0,25
26	223	1,85	0,19
27	165	1,40	0,14
28	151	1,30	0,13
29	121	1,10	0,11
30	125	1,15	0,12
31	78	0,80	0,08
32	80	0,80	0,08
33	80	0,80	0,08
34	68	0,75	0,08
35	58	0,65	0,07
36	58	0,65	0,07
37	49	0,60	0,06
38	46	0,60	0,06
39	43	0,55	0,06
40	43	0,55	0,06
41	36	0,50	0,05
42	33	0,50	0,05
43	33	0,50	0,05
44	32	0,50	0,05
45	28	0,45	0,05



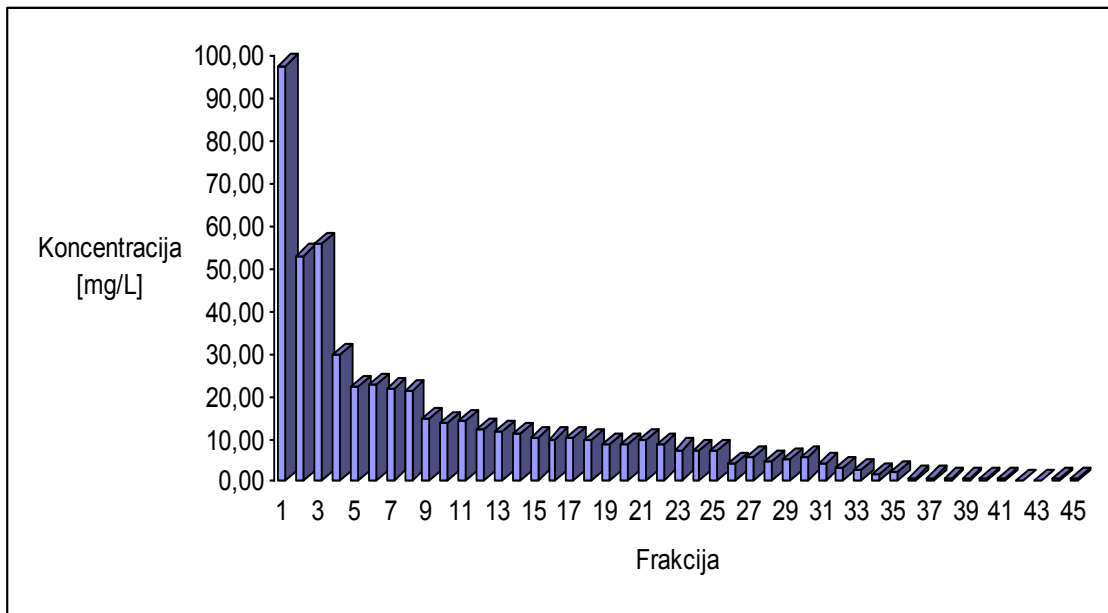
Slika 21: Spreminjanje koncentracije sulfametoksazola v frakcijah izločenih iz kolone z vzorcem tal iz vzorčevalnega mesta 1



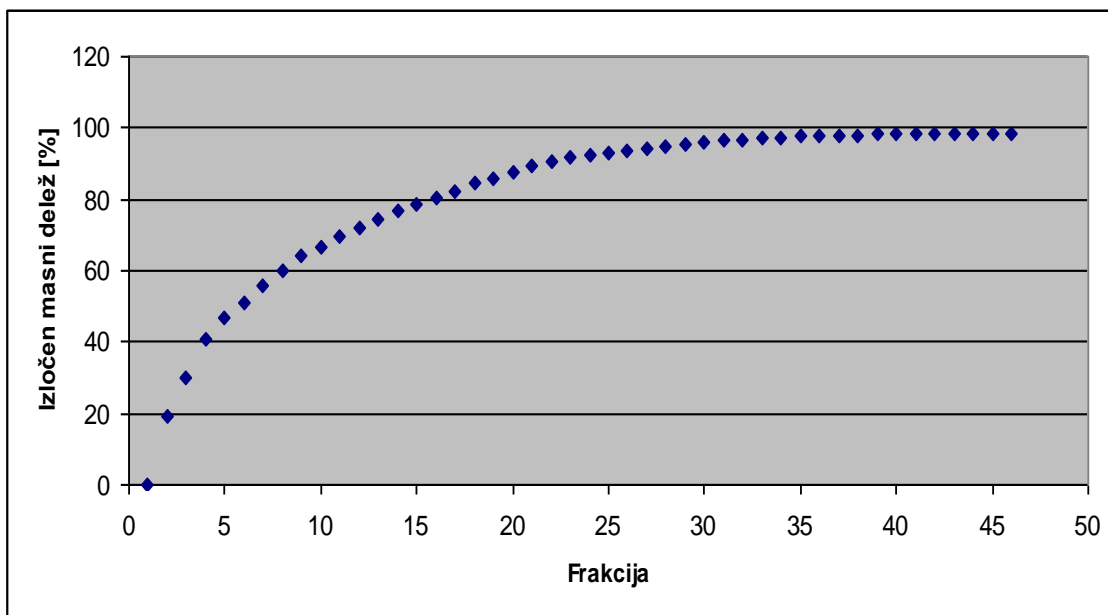
Slika 22: Izločen masni delež sulfametoksazola iz vzorcev tal iz vzorčevalnega mesta 1

Tabela 10: Analize vzorcev izcedne vode tal iz vzorčevalnega mesta 2

FRAKCIJA	POVPREČNA POVRŠINA KROMATOGRFSKEGA VRHA (mAU)	KONCENTRACIJA (mg/L)	MASA (mg)
1	16222	97,55	19,41
2	16871	53,00	10,49
3	17227	55,90	11,07
4	11819	29,90	5,87
5	9475	22,15	4,32
6	9746	22,80	4,45
7	9231	21,55	4,20
8	9009	21,05	4,10
9	6383	14,85	2,86
10	5846	13,60	2,61
11	6183	14,40	2,77
12	5332	12,40	2,37
13	4933	11,95	2,18
14	4445	10,45	1,95
15	4319	10,30	1,89
16	4467	10,00	1,96
17	4312	10,35	1,89
18	3806	9,95	1,65
19	3882	8,80	1,68
20	4248	9,95	1,85
21	2144	9,80	1,20
22	1649	8,94	0,89
23	1407	7,47	0,75
24	1355	7,15	0,72
25	1402	7,44	0,74
26	888	4,32	0,43
27	1139	5,84	0,58
28	985	4,90	0,49
29	1052	5,31	0,53
30	1106	5,64	0,56
31	847	4,06	0,41
32	731	3,36	0,34
33	613	2,64	0,26
34	432	1,54	0,15
35	515	2,04	0,20
36	335	0,95	0,10
37	341	0,99	0,10
38	330	0,92	0,09
39	294	0,70	0,07
40	299	0,73	0,07
41	278	0,60	0,06
42	179	< LOD	0,00
43	197	0,11	0,01
44	277	0,60	0,06
45	287	0,66	0,07



Slika 23: Spreminjanje koncentracije sulfametoksazola v frakcijah izločenih iz kolone z vzorcem tal iz vzorčevalnega mesta 2



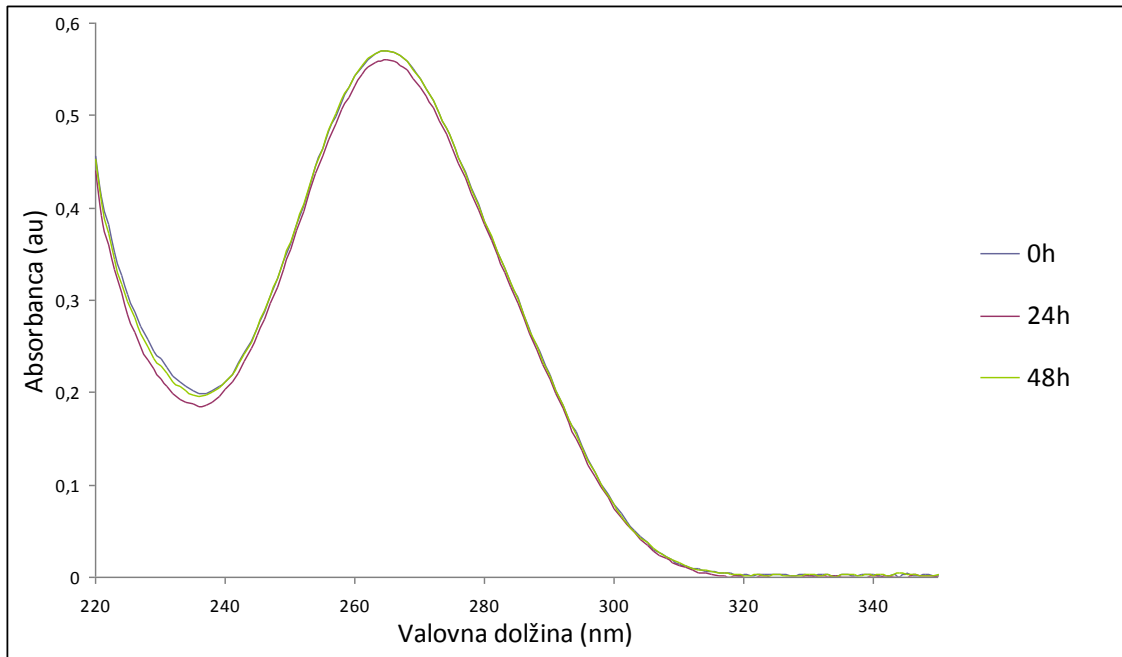
Slika 24: Izločen masni delež sulfametoksazola iz vzorcev tal iz vzorčevalnega mesta 2

4.8 Ugotavljanje stabilnosti sulfametoksazola in ciprofloksacina

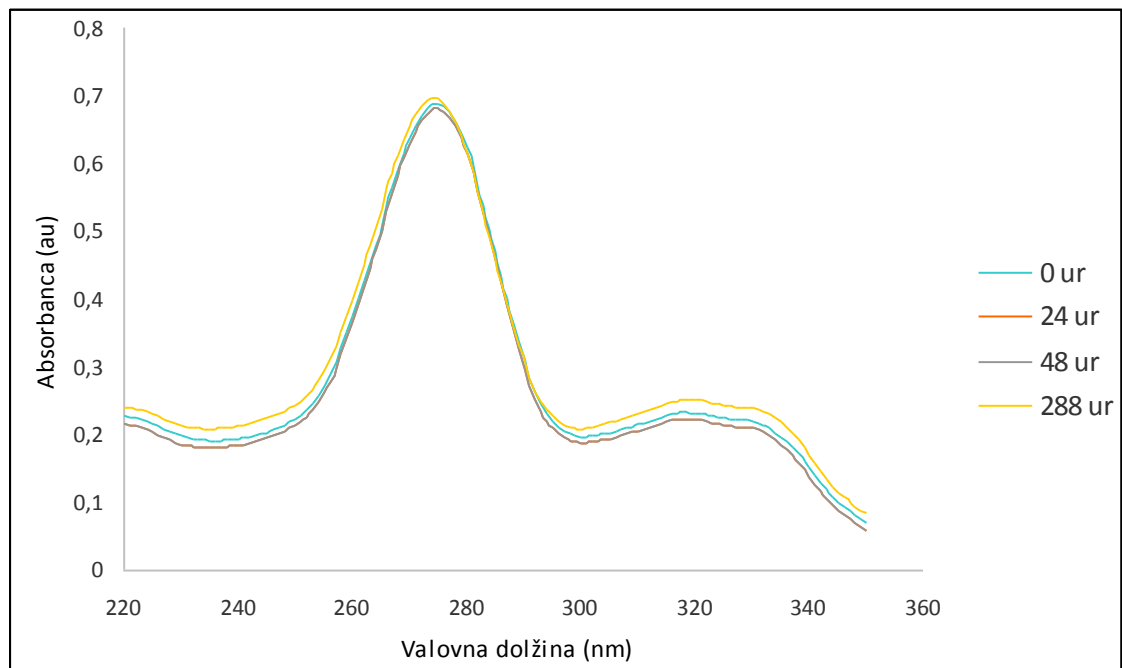
Na Slikah 25 in 26 so prikazani absorpcijski spektri sulfametoksazola in ciprofloksacina izmerjeni s pomočjo UV-Vis spektrofotometra pri preučevanju stabilnosti obeh antibiotikov v vodnih raztopinah. Spektre posameznega antibiotika smo izmerili v različnih časovnih intervalih. Prvo meritev smo opravili v času $t = 0$ h, drugo pri $t = 24$ h in tretjo v času $t = 48$ h. Za ciprofloksacin, ki je bil za nas bolj pomemben, saj smo iskali možen razlog za to, da se iz kolon ni izločil tudi v njegovi nestabilnosti, smo meritve stabilnosti ponovili še po 12 dneh ($t = 288$ h). Iz spreminjanja absorbance s časom smo lahko ocenili stabilnost posameznega antibiotika.

Pri meritvi standardne raztopine sulfametoksazola s koncentracijo 10 mg/L z najvišjo absorbanco pri valovni dolžini 264 nm, je v času 0 absorbanca znašala 0,54 in je s časom rahlo naraščala. Pri meritvah standardne raztopine ciprofloksacina s koncentracijo 5 mg/L je bila absorbanca najvišja pri valovni dolžini 275 nm in sicer, v času 0 je bila enaka 0,69 in se s časom tudi po 12 ni spremenila za več kot 2 % začetne absorbance, kar je znotraj ocenjene eksperimentalne napake.

Za oba antibiotika lahko rečemo, da sta bila znotraj našega poizkusa stabilna. Četudi smo za sulfametoksazol meritve, zaradi okvare spektrofotometra, izvedli le v obdobju 48 ur.



Slika 25: Spreminjanje absorpcijskega spektra sulfametoksazola v času



Slika 26: Spreminjanje absorpcijskega spektra ciprofloksacina v času

Rezultati potrjujejo naše predpostavke, da se sulfametoksazol v tleh ne zadržuje, saj smo ga v obeh vzorcih tal zaznali že v prvih frakcijah izcedne vode iz posamezne kolone. V globino 40 cm se večina sulfametoksazola izpere že z približno 1,5 L vode, kar glede na premer kolon predstavlja količino padavin približno 180 L/m². Hitrost izpiranja sulfametoksazola je odvisna od tipa tal saj se je večina (> 90% izločenega deleža) antibiotika v primeru tal iz vzorčevalnega mesta 2 izločila že z približno 1,5 L dodane vode, v primeru tal iz vzorčevalnega mesta 1 pa po približno 2,5 L dodane vode. To kaže na to, da se v tleh z višjim deležem huminskih snovi (kar smo ocenili na osnovi barve tal iz vzorčevalnega mesta 1) sulfametoksazol počasneje izloča zaradi močnejše vezave v tleh, kar potrjuje tudi ugotovitev, da se je v primeru tal iz vzorčevalnega mesta 1 iz kolon izločilo le 52 % celotne mase nanesenega antibiotika. Ta delež je bil v primeru tal iz vzorčevalnega mesta 2 blizu 100 %, kar poleg hitrosti izpiranja potrjuje manjšo interakcijo sulfametoksazola s takim tipom tal. Samo hitrost izpiranja pri tleh iz vzorčevalnega mesta 2 in delno tudi vzorčevalnega mesta 1 pa lahko razložimo edino z delnim pretokom vode mimo jedra polnitve v koloni (npr. ob stenah kolone ali skozi razpoke v polnitvi), saj sicer sulfametoksazola ne bi mogli zaznati v izločenem volumnu manjšem od mrtvega volumna kolone.

Analize vzorcev izcedne vode s HPLC so potrdile naša predvidevanja, da se bo iz tal hitro izločil sulfametoksazol in da se ciprofloksacin v tleh zadrži, saj ga nismo zaznali v nobenem od vzorcev. To je skladno tudi s podatki iz literature, da je sulfametoksazol visoko mobilan in se v tleh ne zadržuje, medtem ko je za ciprofloksacin značilno, da se v tleh zadrži in močno veže na organsko frakcijo.

Da bi lahko ugotovili, koliko je v kolonah ostankov sulfametoksazola ter kje se nahaja, bi ga morali iz tal ekstrahirati.

Iz rezultatov lahko predvidevamo, da sulfametoksazol predstavlja veliko tveganje za onesnaženje površinskih in podtalnih voda, okoljsko tveganje pa lahko predstavlja tudi kopičenje ciprofloksacina v tleh.

Medtem, ko se sulfametoksazol iz tal izloči prej kot v enem letu tudi v območjih z najmanj padavinami v Sloveniji (npr. Prekmurje z 800 L/m²), pa bi glede na povprečno količino letnih padavin v Sloveniji 1396 L/m² (Statistični urad Republike Slovenije, 2013) za zanesljivejše zaključke v primeru ciprofloksacina, morali čas poizkusa podaljšati vsaj za 2,5 krat.

5 ZAKLJUČKI

Z izvedbo zastavljenega kolonskega poizkusa in opravljenimi analizami s HPLC smo želeli raziskati zadrževanje in stabilnost dveh pogosto uporabljenih antibiotikov v živinoreji, sulfametoksazola in ciprofloksacina.

Najprej smo pripravili kolone, katere smo napolnili z dvema različna tipoma tal. Vzorce tal smo nato onesnažili z znanimi koncentracijami obeh antibiotikov in nato devet dni v kolone dodajali samo vodo, s čimer smo poskušali simulirati padavine v naravnih pogojih. Zbrane vzorce izcedne vode iz kolon smo analizirali s HPLC in izračunali koncentracije in mase antibiotikov, izločene iz kolon.

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da je sulfametoksazol v tleh visoko mobilan in se ne zadržuje, saj se je iz naših kolon izločil relativno hitro, ter da se ciprofloksacin v tleh zadrži in veže na organsko frakcijo, saj se med poizkusom iz kolon ni izločil. Ugotovili smo tudi, da sta oba antibiotika v vodni raztopini stabilna in se v času poizkusa njuna koncentracija ni spreminjala. Oba antibiotika predstavljata tveganje tako za onesnaženje površinskih in podtalnih vod kot tudi tal. Z vidika ekološkega kmetovanja in dvoletnega prehodnega obdobja iz konvencionalne na ekološko pridelavo bi bil bolj primeren sulfametoksazol, saj se iz tal hitro izloči in se v njih ne zadržuje, kar pomeni, da bi se v času tega obdobja iz tal popolnoma izločil.

6 VIRI

1. Al-Ahmad A., Daschner F.D., Kümmerer K. 1999. Biodegradability of cefotiam, ciprofloxacin, meropenem, penicillin G, and sulfamethoxazole and inhibition of waste water bacteria. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 37: 158–163
2. Alcock R.E., Sweetman A., Jones K.C. 1999. Assessment of organic contaminant fate in wastewater treatment plants I. Selected compounds and physiochemical properties. *Chemosphere*, 38: 2247–2262
3. Baumgarten B., Jährig J., Reemtsma T., Jekel M. 2011. Long term laboratory column experiments to simulate bank filtration: Factors controlling removal of sulfamethoxazole. *Water Research*, 45: 211–220
4. Berrada H., Borrull F., Font G., Molto J.C., Marce R.M. 2007. Validation of a confirmatory method for the determination of macrolides in liver and kidney animal tissues in accordance with the European Union regulation 2002/657/EC. *Journal of Chromatography*, 1157: 281–288
5. Blackwell, P.A., Kay P., Boxall A.B.A. 2007. The dissipation and transport of veterinary antibiotics in a sandy loam soil. *Chemosphere*, 67: 292–299
6. Boxall A.B.A., Blackwell P., Cavallo R., Kay P., Tolls J. 2002. The sorption and transport of a sulfonamide antibiotic in soil systems. *Toxicology Letters*, 131: 19–28
7. Boyd B., Björk H., Billing J., Shimelis O., Axelsson S., Leonora M., Yilmaz E. 2007. Development of an improved method for trace analysis of chloramfenicol using molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography*, 1174: 63–71
8. Buchberger W.W. 2007. Novel analytical procedures for screening of drug residues in water, waste water, sediment and sludge. *Analytica Chimica Acta*, 593: 129–139
9. Clive D.L.J. 1968. Chemistry of tetracyclines. *Quarterly Reviews*, 22: 435–457
10. Elmund G.K., Morrison S.M., Grant D.W., Nevins M.P. 1971. Role of excreted chlortetracycline in modifying the decomposition process in feedlot waste. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 6: 129–132
11. Gao B., Ma L.Q., Li H., Chen H. 2011. Effects of pH and ionic strength on sulfamethoxazole and ciprofloxacin transport in saturated porous media. *Journal of Contaminant Hydrology*, 126: 29–36
12. Gao J.A., Pedersen J.A. 2010. Sorption of sulfonamide antimicrobial agents to humic acid-clay complexes. *Journal of Environmental Quality*, 39: 228–235
13. Girardi C., Greve J., Lamshöft M., Fetzer I., Miltner A., Schäffer A., Kästner M. 2011. Biodegradation of ciprofloxacin in water and soil and its effects on the microbial communities. *Journal of Hazardous Materials*, 198: 22–30

14. Gubina M., Ihan A. 2002. Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Ljubljana, Medicinski razgledi: str. 427–447
15. Haller M.Y., Muller S.R., McArdell C.S., Alder A.C., Suter M. 2001. Quantification of veterinary antibiotics (sulfonamids and trimethoprim) in animal manure by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 952: 111–120
16. Halling-Sorensen B. 2001. Inhibition of aerobic growth and nitrification of bacteria in sewage sludge by antibacterial agents. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 40: 451–460
17. Halling-Sorensen B., Sengeløv G., Tjørnelund J. 2002. Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 44: 7–16
18. Hamscher G., Sczesny S., Höper H., Nau H. 2002. Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 74: 1509–1518
19. Ingerslev F., Halling-Sørensen B. 2001. Biodegradability of metronidazole, olaquinox, and tylosin and formation of tylosin degradation products in aerobic soil–manure slurries. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 48: 311–320
20. Ingerslev F., Halling-Sørensen B., 2000. Biodegradability properties of sulfonamids in activated sludge. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19: 2467–2473
21. Joshi S. 2002. HPLC separation of antibiotics present in formulated and unformulated samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 28: 795–809
22. Kay P., Blackwell P.A., Boxall A.B.A. 2004. Fate of veterinary antibiotics in a macroporous tile drained clay soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23 (5): 1136–1144
23. Kemper N. 2007. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological indicators*, 8: 1–13
24. Kolz A.C., Moorman T.B., Ong S.K., Scoggin K.D., Douglass E.A. 2005. Degradation and metabolite production of tylosin in anaerobic and aerobic swine-manure lagoons. *Water Environment Research*, 77: 49–56
25. Kühne M., Ihnen D., Möller G., Agthe O. 2000. Stability of tetracycline in water and liquid manure. *Journal of Veterinary Medicine A*, 47: 379–384
26. Kümmerer K., Al-Ahmad A., Mersch-Sundermann V. 2000. Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test. *Chemosphere*, 40: 701–707

27. Kümmerer K. 2001. Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks. Berlin, Springer: str. 237–265
28. Kümmerer K. 2003. Significance of antibiotics in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52: 5–7
29. Langhammer J.P., Norpoth A., Winkelmann J., Petersen B., Büning-Pfaue H. 1989. Drug residues from slurry and their effect on the development of resistance of *E. coli* isolates from swine. *Zentralbl Hyg Umweltmed*, 189: 151–63
30. Loke M.L., Ingerslev F., Halling-Sørensen B., Tjørnelund J. 2000. Stability of tylosin A in manure containing test systems determined by high performance liquid chromatography. *Chemosphere*, 40: 759–765
31. Marengo J., Kok R., O'Brien K., Velagaleti R., Stamm J. 1997. Aerobic biodegradation of ¹⁴C-sarafloxacin hydrochloride in soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16: 462–471
32. Marolt - Gomišček M. 1992. Antibiotiki in kemoterapevtiki v vsakdanji praksi. Ljubljana, Tangram: str. 85–89
33. Myllyniemi A.L., Ranikko R., Lindfors E., Niemi A. 2000. Microbiological and chemical detection of incurred penicillin G, oxytetracycline, enrofloxacin and ciprofloxacin residues in bovine and porcine tissues. *Food Additives and Contaminants*, 17: 991–1000
34. Oka H., Ito Y., Matsumoto H. 2000. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *Journal of Chromatography B*, 693: 337–344
35. Picó Y., Andreu V., Blasco C. 2007. Analytical strategies to determine quinolone residues in food and the environment. *Trends in Analytical Chemistry*, 26: 534–556
36. Pils J.R.V., Laird D.A. 2007. Sorption of tetracycline and chlortetracycline on K- and Ca-saturated soil clays, humic substances, and clay-humic complexes. *Environmental Science & Technology*, 41: 1928–1933
37. Pinck L.A., Holton W.F., Allison F.E. 1961. Antibiotics in soils: I. Physico-chemical studies of antibiotic-clay complexes. *Soil Science*, 91: 22–28
38. Pinck L.A., Soulides D.A., Allison F.E. 1961. Antibiotics in soil: II. Extent and mechanism of release. *Soil Science*, 91: 94–99
39. Pohl C.H., Kock L.J.F., Swart C.W., Maartens M.J. 2011. Antimicrobials, chemotherapeutics or antibiotics? *Academic Journals*, 19: 1–2
40. Pust B., Štalc A. 1988. Kako deluje? Zdravila. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: str. 120–139
41. Rabølle M., Spliid N. 2000. Sorption and mobility of metronidazole, olaquinox, oxytetracycline and tylosin in soil. *Chemosphere*, 40: 715–722

42. Raspor P. 1992. Biotehnologija. Ljubljana, Bia d.o.o.: str. 397–415
43. Regitano J.B., Leal R.M.P., Alleoni L.R.F., Tornisielo V.L. 2013. Sorption of fluoroquinolones and sulfonamides in 13 Brazilian soils. *Chemosphere*, 92: 979–985
44. Rice D.N., Straw B. 1996. Use of animal drugs in livestock management, University of Nebraska Cooperative Extension University of Nebraska, Lincoln, Nebraska <http://www.ianr.unl.edu/pubs/animaldisease/g1093.htm> (pregledano 5. aprila 2013)
45. Samuelsen O.B., Torsvik V., Ervik A. 1992. Long-range changes in oxytetracycline concentration and bacterial resistance towards oxytetracycline in a fish farm sediment after medication. *Sci. Total Environ*, 114: 25–36
46. Sarmah A.K., Meyer M.T., Boxall A.B.A. 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, 65: 725–759
47. Sassman S.A., Lee L.S. 2005. Sorption of three tetracyclines by several soils: Assessing the role of pH and cation exchange. *Environ. Sci. Technol.*, 39: 7452–7459
48. Sassman S.A., Sarmah A.K., Lee L.S., Oliveira M.F. 2003. Sorption of tylosin and tylosin A-aldol by soils. Presented at the Soil Science Society of America National Meeting, Denver, CO
49. Sengeløv G., Agersø Y., Hallig-Sørensen B., Baloda S.B., Andersen J.S., Jensen L.B. 2003. Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry. *Environment International*, 28: 587–595
50. Statistični urad Republike Slovenije. Izbrani podnebni elementi po meteoroloških postajah, Slovenija, 2012 – končni podatki
51. https://www.stat.si/novica_prikazi.aspx?ID=5463 (pregledano 17. avgust 2013)
52. Tsai W.H, Huang T.C, Huang J.J, Hsue Y.H, Chuang H.Y. 2009. Dispersive solid-phase microextraction method for sample extraction in the analysis of four tetracyclines in water and milk samples by high-performance liquid chromatography with dioda-array detection. *Journal of Chromatography A*, 1216: 2263–2269
53. Turiel E., Martín-Esteban A., Tadeo J.L. 2006. Multiresidue analysis of quinolones and fluoroquinolones in soil by ultrasonic-assisted extraction in small columns and HPLC-UV. *Analytica Chimica Acta*, 562: 30–35
54. UCS (Union of Concerned Scientist), 2001. Hogging it!: Estimates of antimicrobial abuse in livestock
55. http://www.ucsus.org/assets/documents/food_and_agriculture/hog_front.pdf (pregledano 10. aprila 2013)

56. Vasudevan D., Bruland G.L., Torrance B.S., Upchurch V.G., MacKay A.A. 2009. pH-dependent ciprofloxacin sorption to soils: Interaction mechanisms and soil factors influencing sorption. *Geoderma*, 151: 68–76
57. Wehrhan A., Kasteel R., Simunek J., Groeneweg J., Vereecken H. 2006. Transport of sulfadiazine in soil columns – Experiments and modelling approaches. *Journal of Contaminant Hydrology*, 89: 107–135
58. Winckler C., Grafe A. 2001. Use of veterinary drugs in intensive animal production: evidence for persistence of tetracyclines in pig slurry. *Journal of Soils and Sediments*, 1: 66–70
59. Xing B., Zheng H., Wang Z., Zhao J., Herbert S. 2013. Sorption of antibiotic sulfamethoxazole varies with biochars produced at different temperatures. *Environmental Pollution*, 181: 60–67