

Ewa ADAMEK¹, Wojciech BARAN¹, Izabela SZOŁTYSEK-BOŁDYS¹
i Andrzej SOBCZAK²

EFEKTYWNOŚĆ PROCESÓW BIODEGRADACJI ZASTOSOWANYCH DO USUWANIA LEKÓW PRZECIWBAKTERYJNYCH ZE ŚCIEKÓW I WODY RZECZNEJ

EFFICIENCY OF BIODEGRADATION PROCESSES TO REMOVE OF ANTIBACTERIAL DRUGS FROM WASTEWATER AND RIVER WATER

Abstrakt: Celem pracy była ocena skuteczności procesów biodegradacji aerobowej i anaerobowej zastosowanych do usuwania leków przeciwbakteryjnych, tj. ampicyliny, doksycykliny, tylozyny i sulfatiazolu, za pomocą osadów czynnych pochodzących z oczyszczalni ścieków Radocha II w Sosnowcu oraz wody z rzeki Brynicy. Stężenia leków wykorzystywane w eksperymentach były zbliżone do wartości microbial toxic concentration (MTC). Stwierdzono, że z wyjątkiem sulfatiazolu pozostałe antybiotyki bardzo szybko ulegają biologicznemu rozkładowi (zazwyczaj w czasie krótszym niż 24 godziny). Jednak rozkład tych leków w każdym przypadku prowadził do powstania niezidentyfikowanych, bardziej polarnych i trwałych biologicznie związków organicznych. W przypadku sulfatiazolu całkowitemu rozkładowi uległ on jedynie przy zastosowaniu osadu czynnego po 23 dniach w procesie aerobowym. W pozostałych badanych przypadkach lek ten okazał się odporny na biodegradację.

Słowa kluczowe: antybiotyki, środowisko, oczyszczanie ścieków, biodegradacja, osad czynny

Wstęp

Antybiotyki są obecnie używane na szeroką skalę zarówno w leczeniu ludzi, jak i w weterynarii, a także w hodowli zwierząt jako dodatki do pasz. Leki te wraz ze ściekami komunalnymi i szpitalnymi oraz wraz z gnojowicą przedostają się do hydrosfery, powodując m.in. zmiany w biocenozie. Dodatkowo, konsekwencją nadużywania oraz nieprawidłowego stosowania antybiotyków jest rozpowszechnienie opornych na nie bakterii i pasożytów [1, 2]. W rezultacie coraz więcej szczepów chorobotwórczych bakterii jest niewrażliwych na działanie antybiotyków, co utrudnia dobór skutecznej farmakoterapii [3].

Współczesne technologie oczyszczania ścieków oparte są najczęściej na kompilacji aerobowych i anaerobowych procesów biodegradacyjnych. Zaletą takich rozwiązań jest niska cena, prostota i zazwyczaj wysoka efektywność rozkładu substancji organicznych. Jednak wysoka aktywność antymikrobiologiczna antybiotyków może spowodować, że ścieki zawierające te substancje w znacznych ilościach mogą spowodować zakłócenia w pracy biologicznych oczyszczalni ścieków [4]. Na antymikrobiologiczne działanie antybiotyków są głównie narażone mikroorganizmy osadu czynnego, które nie są adaptowane do ścieków zawierających te leki, a więc w oczyszczalniach, do których sporadycznie odprowadza się ścieki z antybiotykami. Konsekwencją może być znaczne

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 64, email: eadamek@sum.edu.pl

² Instytut Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego, ul. Kościelna 13, 41-200 Sosnowiec

* Praca była prezentowana podczas konferencji ECOpole'14, Jarnołtówek, 15-17.10.2014

obniżenie sprawności oczyszczania ścieków. Prace badawcze, w których opisuje się skuteczność usuwania antybiotyków ze ścieków w pracujących biologicznych oczyszczalniach ścieków, podają rozbieżne informacje [4-8]. Opisywane rozbieżności mogą być spowodowane m.in. zróżnicowaniem rodzajów antybiotyków stanowiących zanieczyszczenie oraz ich różnym stężeniem w influencie [4]. W praktyce może to oznaczać, że w każdym indywidualnym przypadku ścieków zawierających antybiotyki należy określić ich oddziaływanie na osad czynny oraz uzyskiwaną efektywność oczyszczania.

Celem pracy była ocena skuteczności procesów biodegradacji aerobowej i anaerobowej zastosowanych do usuwania leków przeciwbakteryjnych, tj. ampicyliny, doksycyliny, tylozyny i sulfatiazolu, za pomocą osadów czynnych pochodzących z oczyszczalni ścieków Radocha II w Sosnowcu oraz wody z rzeki Brynicy. Stężenia leków wykorzystywane w eksperymentach były zbliżone do wartości stężenia toksycznego dla mikroorganizmów (MTC).

Materiały i metody

Wybrane do badań antybiotyki zostały scharakteryzowane w tabeli 1. Osady czynne wykorzystywane w eksperymentach pochodziły z komory tlenowej i komory denitryfikacyjnej oczyszczalni ścieków Radocha II w Sosnowcu. Środowiskiem odniesienia była woda pobrana z nurtu rzeki Brynicy oraz woda destylowana.

Tabela 1

Charakterystyka badanych antybiotyków

Table 1

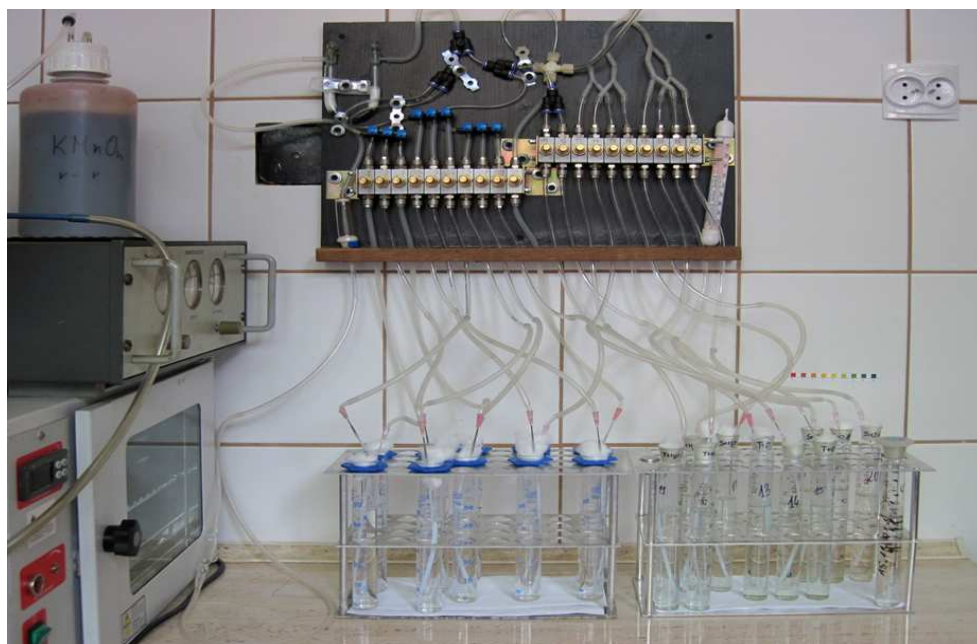
Characteristics of the studied antibiotics

Nazwa (numer CAS)	Producent (czystość)	Stężenie w próbkach/wartość MTC [mg/dm ³]		Warunki analizy HPLC (chromatograf YL9100 Young Lin; Korea Pd.)		
		osad czynny	woda z rzeki	eluent	kolumna	dł. fali detektora [nm]
Ampicylina - sól sodowa (69-53-4)	Sigma-Aldrich (91,0-100,5)	80/82	48/50	AcCN - 5%; 0,1% roztwór HCOOH - 95%	Supelcosil LC-18; 5 µm; 250×4,6 mm	210
Tylozyny winian (1401-69-0)	Sigma-Aldrich (moc leku ≥ 800 jednostki/mg)	80/89	30/33	AcCN - 70%; roztwór H ₃ PO ₄ o pH 2,7 - 30%	Hypersil C-18; 5 µm; 150×2,1 mm	290
Doksycyliny hyklan (24390-14-5)	Sigma-Aldrich (≥ 98%)	30/34	1/1,5	AcCN - 70%; roztwór H ₃ PO ₄ o pH 2,7 - 30%	Hypersil C-18; ziarno 5 µm; 150×2,1 mm	360
Sulfatiazol - sól sodowa (144-74-1)	Sigma-Aldrich (> 99%)	250/261	40/42	AcCN - 5%; 0,1% roztwór HCOOH - 95%	Supelcosil LC-18; 5 µm; 250×4,6 mm	272

W celu oznaczanie wartości MTC badanych antybiotyków niezwłocznie po pobraniu próbki z oczyszczalni ścieków i rzeki zostały wykorzystane do szczepienia pożywek w teście płytkowym. Jako pożywkę, podobnie jak w teście MARA[®], stosowano wodny

roztwór zawierający 2% (m/m) peptonu sojowego (Fluka) i 0,02% (m/m) chlorku 2,3,5-trifenyloctanowego (POCh). Procedura przygotowania płytek 96 dołowych z gradientem stężeń badanych antybiotyków została szczegółowo opisana przez Wadhia i in. [9]. Pożywki szczepiono bezpośrednio porcjami wody lub osadu czynnego o objętości 15 mm³. Płytki skanowano po 24-godzinnej inkubacji w temp. 30°C i analizowano z użyciem oprogramowania do wyznaczania wartości MTC firmy NCIMB Ltd, Szkocja.

Roztwory do badań, zawierające stężenia antybiotyków, odpowiadające wcześniej wyznaczonym wartościom MTC (tab. 1), przygotowywano, rozpuszczając naważki antybiotyków w osadzie czynnym, wodzie rzecznej i wodzie destylowanej, a następnie umieszczano je w zestawie reaktorów aerobowych o objętości 50 cm³ (rys. 1) lub anaerobowych o objętości 100 cm³.



Rys. 1. Zestaw do prowadzenia biodegradacji w warunkach tlenowych

Fig. 1. Experimental set-up for aerobic biodegradation

Powietrze do reaktorów aerobowych, które było tłoczone za pomocą kompresora bezolejowego Aristo B110 (Włochy), poddawano filtracji, dezynfekcji roztworem KMnO₄, separacji i ponownej filtracji na złożu węglowym. Reaktory z próbkami anaerobowe zawierały kulkę szklaną i były mieszane przez 15 min co 1 godzinę za pomocą wytrząsarki. Proces biodegradacji prowadzono każdorazowo przez 28 dni w temperaturze 22 ± 1°C. Elementy zestawów mające kontakt z próbkami były przed każdym eksperymentem sterylizowane. Efekty biodegradacji oceniano na podstawie obniżenia stężenia badanych antybiotyków w próbkach, oznaczanego metodą HPLC. Tak zdefiniowana biodegradacja

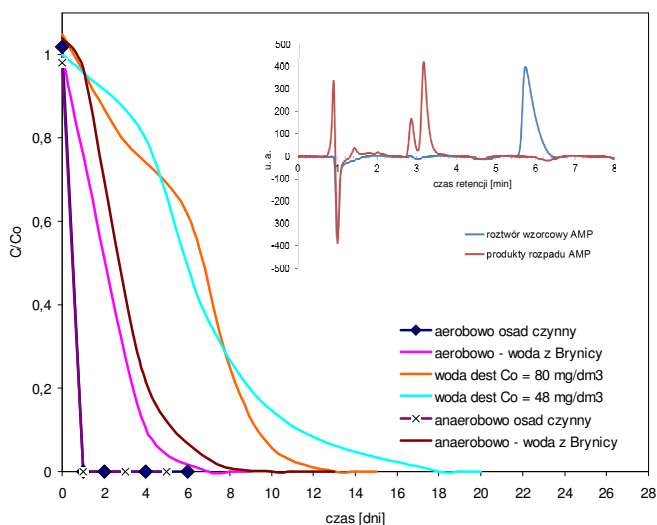
nie oznacza mineralizacji badanych leków. Szczegółowe warunki analizy zamieszczono w tabeli 1.

Rezultaty i dyskusja

Wartości MTC badanych antybiotyków wyznaczone dla osadu czynnego i wody z rzeki zamieszczono w tabeli 1. Wielkości te odzwierciedlają odporność najmniej wrażliwych mikroorganizmów bytujących w badanym ekosystemie, a zatem powinny stanowić graniczne stężenie dla procesów biodegradacji.

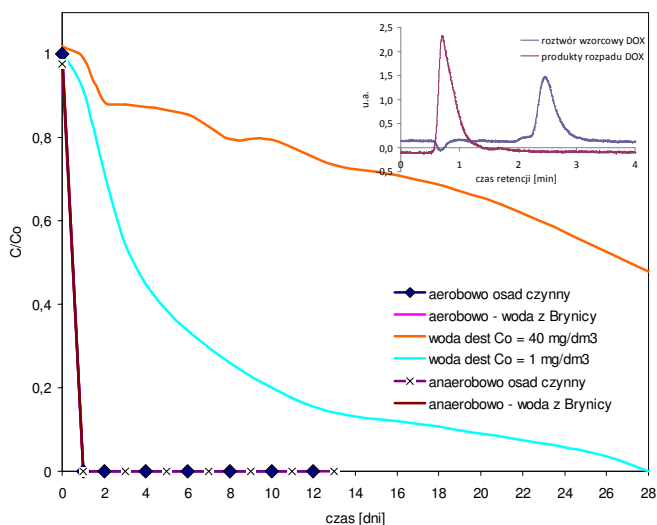
Na rysunkach 2-5 pokazano zmiany stężeń badanych antybiotyków obserwowane w ciągu 28 dni w osadzie czynnym, wodzie rzecznej i w wodzie destylowanej. Zmiany te ilustrują rozkład lub transformację tych antybiotyków do innych związków chemicznych.

W trakcie eksperymentów procesy chemiczne zachodzące bez udziału mikroorganizmów w wodzie destylowanej powodowały całkowity rozkład ampicyliny (rys. 2, niezależnie od stężenia w czasie krótszym niż 18 dni) oraz doksyicyliny o stężeniu początkowym wynoszącym 1 mg/dm³ (rys. 3). W przypadku roztworów doksyicyliny o $C_o = 40$ mg/dm³ oraz tylozyny (rys. 4) również obserwowano obniżenie stężeń tych antybiotyków, odpowiednio o ok. 50 i 20%. W warunkach eksperymentu całkowicie trwał okazały się wodne roztwory sulfatiazolu (rys. 5).



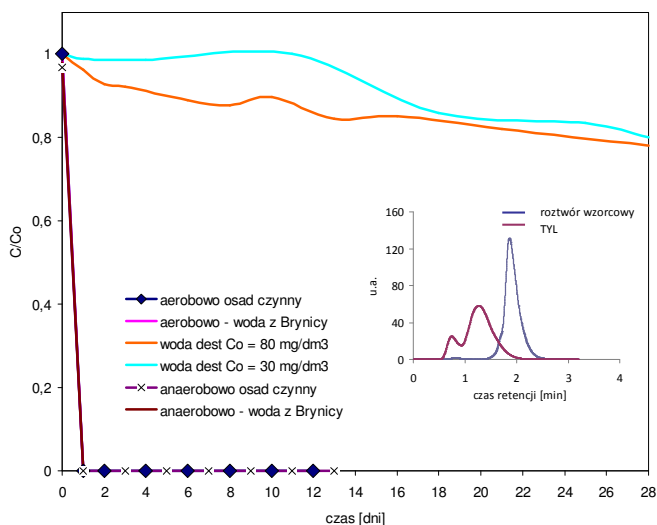
Rys. 2. Dynamika zmian stężenia ampicyliny w osadzie czynnym, wodzie rzecznej i wodzie destylowanej oraz porównanie przykładowych chromatogramów uzyskanych dla roztworu ampicyliny ($C_o = 80$ mg/dm³) przed i po 1 dobie biodegradacji aerobowej z osadem czynnym

Fig. 2. The dynamics of changes of ampicillin concentration in activated sludge, river's water and distilled water and the comparison of the chromatograms obtained for ampicillin solution ($C_o = 80$ mg/dm³) before and after 24 hours of aerobic biodegradation with activated sludge



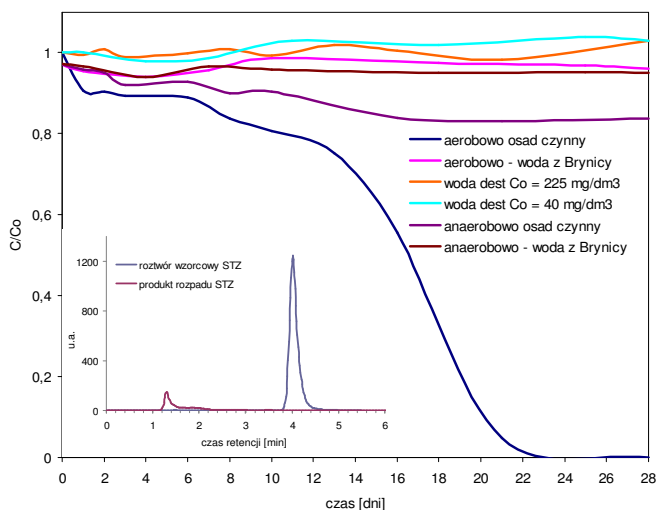
Rys. 3. Dynamika zmian stężenia doksycykliny w osadzie czynnym, wodzie rzecznej i wodzie destylowanej oraz porównanie przykładowych chromatogramów uzyskanych dla roztworu doksycykliny ($C_0 = 1 \text{ mg/dm}^3$) przed i po 1 dobie biodegradacji aerobowej z osadem czynnym

Fig. 3. The dynamics of changes of doxycycline concentration in activated sludge, river's water and distilled water and the comparison of the chromatograms obtained for doxycycline solution ($C_0 = 1 \text{ mg/dm}^3$) before and after 24 hours of aerobic biodegradation with activated sludge



Rys. 4. Dynamika zmian stężenia tylozyny w osadzie czynnym, wodzie rzecznej i wodzie destylowanej oraz porównanie przykładowych chromatogramów uzyskanych dla roztworu tylozyny ($C_0 = 80 \text{ mg/dm}^3$) przed i po 1 dobie biodegradacji aerobowej z osadem czynnym

Fig. 4. The dynamics of changes of tylosin concentration in activated sludge, river's water and distilled water and the comparison of the chromatograms obtained for tylosin solution ($C_0 = 80 \text{ mg/dm}^3$) before and after 24 hours of aerobic biodegradation with activated sludge



Rys. 5. Dynamika zmian stężenia sulfatiazolu w osadzie czynnym, wodzie rzecznej i wodzie destylowanej oraz porównanie przykładowych chromatogramów uzyskanych dla roztworu sulfatiazolu ($C_0 = 250 \text{ mg/dm}^3$) przed i po 21 dobach biodegradacji aerobowej z osadem czynnym

Fig. 5. The dynamics of changes of sulfathiazole concentration in activated sludge, river's water and distilled water and the comparison of the chromatograms obtained for sulfathiazole solution ($C_0 = 250 \text{ mg/dm}^3$) before and after 24 hours of aerobic biodegradation with activated sludge

W przeprowadzonych eksperymentach rozkład (transformacja) badanych antybiotyków z udziałem mikroorganizmów okazał się znacznie szybszy. Zgodnie z oczekiwaniami, najkorzystniejsze okazało się zastosowanie osadu czynnego. Stwierdzono, że w warunkach aerobowych i anaerobowych ampicylina, doksycyklina i tylozyna ulegały całkowitej biodegradacji w czasie krótszym niż 1 dzień. Sulfatiazol w warunkach aerobowych rozkładał się ciągu 23 dni, natomiast w warunkach anaerobowych w ciągu 28 dni stężenie sulfatiazolu obniżyło się o mniej niż 20%. W ekosystemie rzeki Brynicy, niezależnie od warunków tlenowych, całkowita biodegradacja doksycykliny i tylozyny również trwała krócej niż 1 dzień, a ampicyliny 7-8 dni. Sulfotiazol w tym przypadku okazał się niebiodegradowalny.

Opisane wyżej rezultaty wskazują, że sulfatiazol jest znacznie bardziej odporny chemicznie i biologicznie od pozostałych antybiotyków. Może to oznaczać, że wprowadzony do środowiska będzie oddziaływał na obecną w nim biocenozę przez znacznie dłuższy czas. Duża szybkość biodegradacji pozostałych antybiotyków nie oznacza jednoznacznie wysokiej efektywności tego procesu z punktu widzenia obniżenia ryzyka środowiskowego. We wszystkich przypadkach procesom biodegradacji towarzyszyło powstawanie produktów transformacji antybiotyków (chromatogramy na rys. 2-5). W przeprowadzonych badaniach stwierdzono, że substancje te posiadały te same grupy chromoforowe co wyjściowe antybiotyki i, z wyjątkiem produktów biodegradacji ampicyliny, w ciągu 28 dni nie ulegały dalszemu rozkładowi. Istnieje wysokie ryzyko, że powstające w trakcie procesów biologicznych substancje całkowicie lub częściowo zachowują aktywność antymikrobiologiczną. Dane literaturowe wskazują, że produktem

rozkładu sulfonamidów jest najczęściej bardziej aktywny biologicznie sulfanilamid [10], tylozyna może ulegać transformacji do innej formy leku, np. tylozyny D [4, 11], natomiast doksycyklina do mniej aktywnych 6-epidoksycykliny oraz metacykliny [12]. Oznacza to, że pełna ocena efektywności procesu biodegradacji wymaga analizy aktywności antymikrobiologicznej produktów tego procesu i ewentualną ich identyfikację. Niemniej, już na podstawie uzyskanych rezultatów można stwierdzić, że zasadność zastosowania technologii wykorzystujących zjawisko biodegradacji do usuwania leków przeciwbakteryjnych ze ścieków zależy od rodzaju leku, jaki ma zostać usunięty.

Wnioski

Badane antybiotyki hamują rozwój mikroorganizmów pochodzących z wody rzecznej i osadu czynnego. Mimo to przy stężeniach bliskich MTC bardzo szybko (z wyjątkiem sulfatiazolu) ulegają biologicznemu rozkładowi. Jednak rozkład tych leków w każdym przypadku prowadził do powstania niezidentyfikowanych, bardziej trwałych biologicznie związków organicznych. W przypadku sulfatiazolu całkowitemu rozkładowi uległ on jedynie przy zastosowaniu osadu czynnego po 23 dniach w procesie aerobowym. W pozostałych badanych przypadkach lek ten okazał się odporny na biodegradację.

Zasadność zastosowania technologii wykorzystujących zjawisko biodegradacji do usuwania leków przeciwbakteryjnych ze ścieków zależy od rodzaju leku, jaki ma zostać usunięty, jednak pełna ocena efektywności procesu biodegradacji wymaga analizy aktywności antymikrobiologicznej produktów tego procesu.

Podziękowania

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

Literatura

- [1] DANMAP 2012 - Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. http://www.danmap.org/Downloads/~media/Projekt%20sites/Danmap/DANMAP%20reports/DANMAP%202012/Danmap_2012.ashx.
- [2] Eintrag von Arzneimitteln und deren Verhalten und Verbleib in der Umwelt. Literaturstudie Fachbericht 2, Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen, Recklinghausen, 2007. <http://www.lanuv.nrw.de/veroeffentlichungen/fachberichte/fabe2/lanuvfabe2.pdf>.
- [3] Baran W, Adamek E, Makowski A, Sobczak A. *Ecol Chem Eng A*. 2012;9:1153-1171. DOI: 10.2428/ecea.2012.19(10)110.
- [4] Michael I, Rizzo L, McArdell C, Manaia C, Merlin C, Schwartz T, et al. *Water Res*. 2013;47:957-995. DOI: 10.1016/j.watres.2012.11.02.
- [5] Guerra P, Kim M, Shah A, Alaei M, Smyth A. *Sci Total Environ*. 2014;473-474:235-243. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.12.008.
- [6] Gracia-Lor E, Sancho J, Serrano R, Hernández F. *Chemosphere*. 2012;87:453-462. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2011.12.025.
- [7] Gao L, Shi Y, Li W, Niu H, Liu J, Cai Y. *Chemosphere*. 2012;86:665-671. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2013.01.040.
- [8] Verlicchi P, Al Aukidy M, Jelic A, Petrović M, Barceló D. *Sci Total Environ*. 2014;470-471:844-854. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.10.026.
- [9] Wadhia K, Dando T, Thompson KC. *J Environ Monit*. 2007;9:953-958. DOI: 10.1039/b704059h.
- [10] Sukul P, Spitteller M. *Rev Environ Contam Toxicol*. 2006;187:67-101. DOI: 10.1007/0-387-32885-8_2.
- [11] 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.

- [12] Skúlason S, Ingólfsson E, Kristmundsdóttir T. J Pharm Biomed Anal. 2003;33:667-672. DOI: 10.1016/S0731-7085(03)00316-9.

EFFICIENCY OF BIODEGRADATION PROCESSES TO REMOVE OF ANTIBACTERIAL DRUGS FROM WASTEWATER AND RIVER WATER

¹ Department of General and Analytical Chemistry, School of Pharmacy with the Division of Laboratory Medicine
Medical University of Silesia in Katowice, Sosnowiec

² Institute of Occupational Medicine and Environmental Health, Sosnowiec

Abstract: Nowadays, antibiotics are used on a large scale, both in veterinary and human medicine as well as in animal husbandry as feed additives. These drugs with municipal and hospital wastewater and with liquid manure can get into the hydrosphere resulting in, among others, changes in the biocenosis. In addition, the consequence of excessive and improper use of antibiotics can be the spread of bacteria and parasites that are resistant to them. In result, an increasing number of pathogenic bacteria strains is insensitive to antibiotics and a choice of effective pharmacotherapy may become more difficult. The aim of this study was to assess the efficiency of aerobic and anaerobic biodegradation processes for the removal of antimicrobial drugs, *ie* ampicillin, doxycycline, tylosin and sulfathiazole using the active sludge from the wastewater treatment plant "Radocha II" in Sosnowiec and water from the Brynica river. The antibiotics concentrations used in the experiments were similar to the Microbial Toxic Concentrations (MTC) values. It was found that ampicillin, doxycycline and tylosin were biodegradable rapidly within less than 24 hours. However, in each case, the degradation of these antibiotics led to the formation of unidentified, more polar and biologically persistent organic compounds. Contrary, sulfathiazole was completely degraded after 23 days in aerobic process using activated sludge and it was resistant to biodegradation in the other experiments.

Keywords: antibiotics, environment, wastewater treatment, biodegradation, activated sludge