

Wojciech BARAN<sup>1</sup>, Ewa ADAMEK<sup>1</sup>, Ilona LIPSKA<sup>1</sup> i Andrzej SOBCZAK<sup>1,2</sup>

## WPLYW WŁAŚCIWOŚCI INOKULUM NA OCENĘ PODATNOŚCI LEKÓW PRZECIWBAKTERYJNYCH NA BIODEGRADACJĘ

### EFFECT OF INOCULUM PROPERTIES ON THE ASSESSMENT OF ANTIMICROBIAL DRUGS SUSCEPTIBILITY TO BIODEGRADATION

**Abstrakt:** Celem pracy było określenie, jaki wpływ na wynik testu biodegradowalności czterech wybranych sulfonamidów (wykonanego zgodnie z normą ISO 9887:1992(E)) mają termin i miejsce pobrania inokulum. Dodatkowo porównano wyniki uzyskane zgodnie z ww. normą z rezultatami otrzymanymi podczas rozkładu tych sulfonamidów w warunkach aerobowych w rzeczywistych próbkach środowiskowych (tożsamych z próbkami służącymi do przygotowania inokulum). Próbki środowiskowe pobierano z nurtu Brynicy oraz Czarnej Przemyszy co miesiąc, rozpoczynając od 29.02.2012 roku. W pobranych próbkach oznaczano ChZT, Abs<sub>254nm</sub>, pH, mętność oraz przewodnictwo. Próbki w dniu pobrania aplikowano wybranymi sulfonamidami lub przygotowywano z nich inokulum. Czas trwania testu wynosił każdorazowo 28 dni. Stwierdzono, że istnieje dodatnia korelacja pomiędzy szybkością biodegradacji sulfonamidów a średnią temperaturą miesiąca poprzedzającego pobór próbki. Istotny wpływ na biodegradację sulfonamidów ma również ich rodzaj oraz incydentalne zanieczyszczenie środowiska, z którego pobierano próbki. Wyniki uzyskane w znormalizowanym teście biodegradowalności w niektórych przypadkach znacznie różniły się od otrzymanych w rzeczywistych próbkach środowiskowych.

**Słowa kluczowe:** biodegradacja, biodegradowalność, sulfonamidy, inokulum

#### Wstęp

We współczesnej medycynie sulfonamidy o właściwościach bakteriostatycznych tracą na znaczeniu, jednak w weterynarii nadal należą do najczęściej stosowanych leków przeciwbakteryjnych. Zgodnie z danymi zawartymi w raporcie DANMAP [1], w procesie hodowlanym prowadzącym do wyprodukowania 1 kg mięsa zużywa się od 0,0033 (brojlery) do 58,5 mg (ryby hodowlane) sulfonamidów. W konsekwencji, stężenie tych leków w oborniku zwierząt gospodarskich może wynieść nawet 400 mg/kg [1, 2], a wg Turkdogan i Yetilmezsoy [3] aż 80% trafia do środowiska.

Ryzyko związane z obecnością sulfonamidów w biosferze polega głównie na tym, że dzięki swojej wysokiej aktywności mikrobiologicznej sprzyjają generowaniu lekooporności u drobnoustrojów [2]. Ten negatywny efekt zależy m.in. od szybkości rozkładu sulfonamidów [4]. W środowisku mogą one ulegać rozkładowi w następstwie niektórych naturalnych procesów fizykochemicznych [5], jednak większe znaczenie ma ich potencjalna biodegradacja [2]. Różnice występujące w budowie poszczególnych sulfonamidów implikują zróżnicowanie ich właściwości fizykochemicznych oraz różną odporność na procesy biologicznego rozkładu. Z kolei, wielkości te mają istotne znaczenie z punktu widzenia oddziaływania sulfonamidów na środowisko.

Opublikowane informacje dotyczące szybkości biologicznego rozkładu sulfonamidów w sposób istotny różnią się między sobą. Według Klimiuk i Łebkowskiej [6], różnice te

<sup>1</sup> Zakład Chemii Ogólnej i Nieorganicznej, Śląski Uniwersytet Medyczny, ul. Jagiellońska 4, Sosnowiec, tel. 32 364 15 62, email: bw-xxl@wp.pl

<sup>2</sup> Instytut Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego, ul. Kościelna 13, Sosnowiec

\* Praca była prezentowana podczas konferencji ECOpole'12, Zakopane, 10-13.10.2012

mogą być spowodowane różnymi procedurami stosowanymi w badaniach. Jednak równie duże różnice pojawiają się w wynikach uzyskiwanych dla tej samej substancji pomimo stosowania standaryzowanej procedury. Według autorów raportu Posejdon [7], wyznaczając stałą szybkości biodegradacji sulfametoksazolu (SMX) przy zastosowaniu identycznych procedur, lecz w różnych laboratoriach, uzyskano wartości wynoszące od 0,1 do 10 dm<sup>3</sup>/g osadu czynnego · dzień.

Równie istotne różnice istnieją w ocenie efektywności biodegradacji sulfonamidów w wodach powierzchniowych. Lai i Hou [8] określili czas półtrwania sulfonamidów w wodzie pobranej ze stawu na 1,7-47,6 dni. Z kolei Al-Ahmad i in. [2] również w wodzie ze stawu nie zaobserwowali degradacji SMX w ciągu 40 dni [9]. Także ocena efektywności rozkładu sulfonamidów w biologicznych oczyszczalniach ścieków daje rozbieżne wyniki.

Celem naszej pracy było:

- określenie, jaki wpływ na wynik testu biodegradowalności czterech wybranych sulfonamidów, wykonanego zgodnie z normą ISO 9887:1992(E), ma termin i miejsce pobrania inokulum,
- porównanie wyników uzyskanych zgodnie z ww. normą z rezultatami otrzymanymi podczas rozkładu tych sulfonamidów w warunkach aerobowych w rzeczywistych próbkach środowiskowych (tożsamy z próbkami służącymi do przygotowania inokulum).

## Materiały i metody

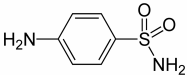
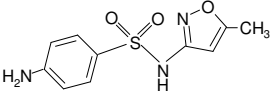
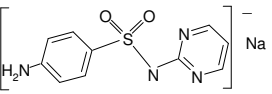
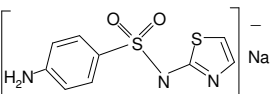
Wybrane do badań sulfonamidy zostały scharakteryzowane w tabeli 1.

Tabela 1

Charakterystyka badanych sulfonamidów

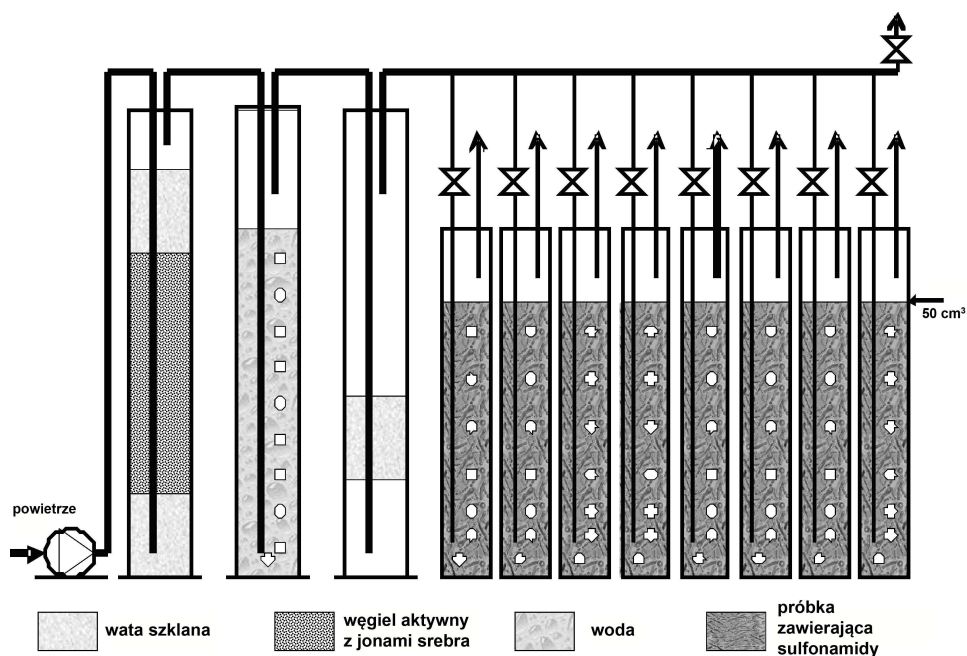
Table 1

Characteristics of the investigated sulfonamides

Sulfonamid	Symbol	Stuktura chemiczna	Numer CAS	Producent	Czystość	Stężenie wyjściowe w próbkach [mg/dm <sup>3</sup> ]
Sulfanilamid	SNA		63-74-1	POCH	cz.	10
Sulfametoksazol	SMX		723-46-6	Sigma	99%	10
Sulfadiazyna (sól sodowa)	SDZ		68-35-9	Sigma	99%	10
Sulfatiazol (sól sodowa)	STZ		72-14-0	Sigma	99%	10

Próbki środowiskowe pobierano z nurtu dwóch rzek, mianowicie Czarnej Przemszy i Brynicy. Według kryteriów Ramowej Dyrektywy Wodnej są to wody V klasy jakości ze względu na takie parametry, jak: zawiesina, tlen rozpuszczony, BZT<sub>5</sub>, ChZT, OWO, amoniak Kjeldahla, azot ogólny, fosforany, fosfor ogólny, przewodność elektrolityczna, substancje rozpuszczone, siarczany, chlorki, wapń, sorbowatość fitoplanktonu, liczba bakterii grupy coli typu kałowego, liczba bakterii grupy coli [10]. Terminy poboru próbek, lokalizację punktu poboru oraz podstawowe właściwości pobranej wody zebrano w tabeli 2.

Niezwłocznie po pobraniu do badanych próbek dodawano 1 cm<sup>3</sup> roztworu zawierającego stężoną mieszaninę badanych sulfonamidów (tab. 1). Równolegle próbki wykorzystano do szczepienia ścieków syntetycznych (SW) przygotowanych zgodnie z normą ISO 9887:1992(E) i aplikowanych identyczną dawką sulfonamidów. Po intensywnym mieszaniu próbki umieszczano w zestawie przedstawionym na rysunku 1.



Rys. 1. Schemat reaktora do badań biodegradacji

Fig. 1. Scheme of the biodegradation test reactor

Proces biodegradacji prowadzono w cyklach 28-dniowych w warunkach aerobowych, przy przepływie powietrza  $\sim 5$  cm<sup>3</sup>/min (nasylenie tlenem wynosiło  $> 90\%$ ), w temperaturze  $21,2 \pm 1,8^\circ\text{C}$  i przy natężeniu oświetlenia  $< 10$  W/m<sup>2</sup> ( $< 1\%$  UV).

Stężenie sulfonamidów wyznaczano metodą HPLC (detektor - Waters TAD-486,  $\lambda$  254 nm; pompa - Knauer 64, przepływ - 1,0 cm<sup>3</sup>/min; kolumna - Supelcosil LC-18, 250x4,6 mm, ziarno 5  $\mu\text{m}$ ; faza ruchoma - bufor zawierający 20 mmol/dm<sup>3</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

o pH = 8,2; acetonitryl - 95:5). Ewentualną sorpcję sulfonamidów na składnikach próbek pominięto (na podstawie analizy literatury uznano za nieznaczącą [12]).

Tabela 2

Charakterystyka próbek wody

Table 2

Characteristics of water samples

Data poboru próbki	Symbol w tekście	pH	ChZT <sub>Cr</sub> [mg O <sub>2</sub> /dm <sup>3</sup> ]	χ [mS/cm]	Abs <sub>254nm</sub>	Mętność [FTU]	Średnia temp. <sup>1</sup> [°C]
Rzeka Czarna Przemsza 50°15'32.724"N, 19°8'14.892"E							
29.02.2012	CP-1	7,20	15	0,860	0,221	17,8	-6,0
28.03.2012	CP-2	6,95	>1500	0,964	>2,5	>1400	5,2
8.05.2012	CP-3	7,25	17	0,740	0,222	25,5	10
6.06.2012	CP-4	7,90	19	0,713	0,166	12,5	15,6
3.07.2012	CP-5	7,76	18	0,697	0,130	6,7	17,8
31.07.2012	CP-6	7,55	20	0,757	0,168	14,3	20,1
28.08.2012	CP-7	7,52	18	0,735	0,136	8,2	19,6
Rzeka Czarna Przemsza 50°16'14.808"N, 19°8'21.731"E							
28.03.2012 <sup>2</sup>	CP <sup>2</sup> -2	7,45	120	0,822	0,249	23,3	5,2
Rzeka Brynica 50°15'33.083"N, 19°8'12.299"E							
29.02.2012	B-1	6,40	52	1,936	0,265	36,2	-6,0
28.03.2012	B-2	7,45	27	1,820	0,250	34,2	5,2
8.05.2012	B-3	7,65	28	2,94	0,253	28,8	10
6.06.2012	B-4	7,70	51	3,16	0,343	67,0	15,6
3.07.2012	B-5	7,67	23	3,37	0,179	18,4	17,8
31.07.2012	B-6	7,67	21	3,43	0,185	16,0	20,1
28.08.2012	B-7	6,60	24	2,84	0,171	11,3	19,6

<sup>1</sup> Średnia temperatura miesiąca poprzedzającego pobór próbki [11]

<sup>2</sup> Próbkę pobrano powtórnie w nowej lokalizacji ze względu na silne zanieczyszczenie rzeki poniżej oczyszczalni ścieków Sosnowiec-Radocha

Średnią szybkość połowicznego rozkładu sulfonamidów ( $r_{0,5}$ ) obliczano ze wzoru:

$$r_{0,5} = \frac{C_0}{2T_{0,5}}$$

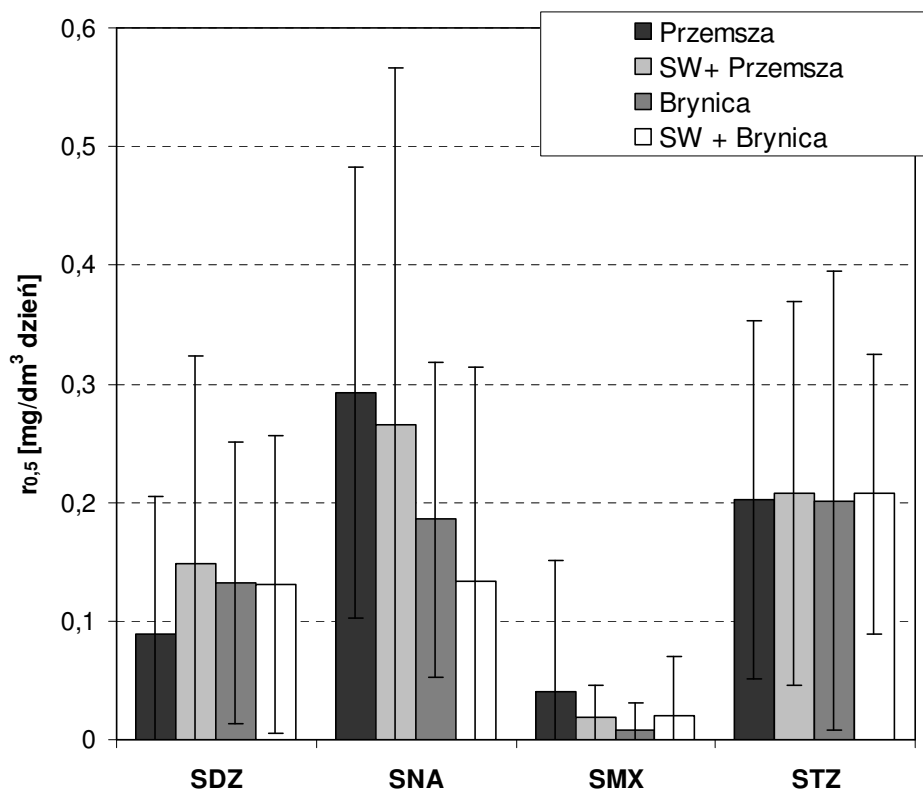
gdzie:  $C_0$  - stężenie początkowe sulfonamidu [mg/dm<sup>3</sup>],  $T_{0,5}$  - czas jego połowicznego rozkładu [dni]. Wartości  $T_{0,5}$  wyznaczano dwoma metodami:

- dla  $T_{0,5} < 28$  dni graficznie z przebiegu funkcji  $C/C_0 = f(t)$ ,
- dla  $T_{0,5} > 28$  dni obliczano na podstawie stałej szybkości reakcji I rzędu z uwzględnieniem czasu adaptacji próbek.

Jeżeli ubytek sulfonamidu po 28 dniach był < 5%, uznawano, że biodegradacja praktycznie nie zachodzi, a wartość  $r_{0,5} = 0$ .

## Omówienie wyników

W większości badanych próbek w ciągu 28 dni obserwowano obniżenie stężenia sulfonamidów. Wyznaczone na podstawie wszystkich wyników średnie wartości  $r_{0,5}$  (w zależności od pochodzenia próbki i stosowanej procedury badawczej) zamieszczono na rysunku 2.

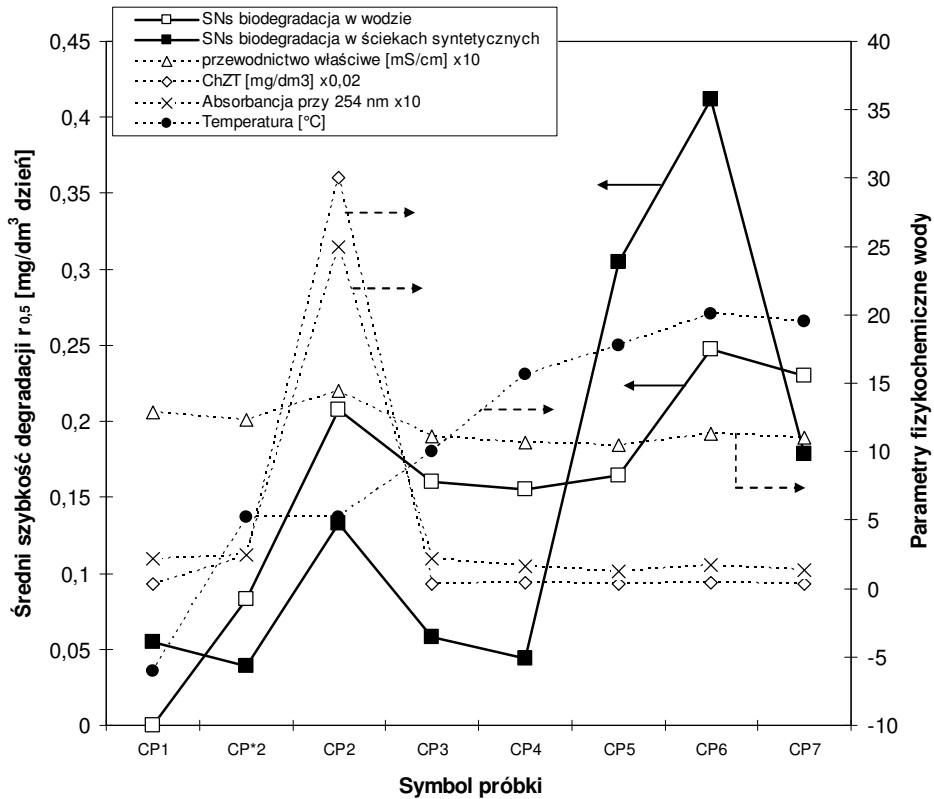


Rys. 2. Wpływ matrycy i stosowanej procedury na szybkość biodegradacji sulfonamidów  
 Fig. 2. Effect of the matrix and the used procedure on the biodegradation rate of sulfonamides

Stwierdzono, że w zastosowanych warunkach SMX praktycznie nie ulegał biodegradacji. Oszacowano, że czas jego połowicznego zaniku wynosi > 120 dni. W rzeczywistości jednak na 15 badanych próbek po 28 dniach inkubacji obserwowano obniżenie stężenia SMX o > 5% jedynie w 2 przypadkach w wodzie z rzeki i w 4 przypadkach w SW.

Pozostałe badane sulfonamidy ulegały rozkładowi znacznie szybciej. Najniższą średnią wartość  $T_{0,5} \cong 16$  dni wyznaczono dla SNA w wodzie z Czarnej Przemyszy. Z wyjątkiem SNA, niezależnie od rodzaju matrycy i stosowanej procedury, uzyskano zbliżone wartości średnie, aczkolwiek obarczone wysokim odchyleniem standardowym.

Na rysunkach 3 i 4 przedstawiono rozkład wartości  $r_{0,5}$  - obliczonych jako średnia arytmetyczna dla wszystkich sulfonamidów w poszczególnych badanych próbkach - oraz podstawowe parametry fizykochemiczne wody i średnią miesięczną temperaturę powietrza.

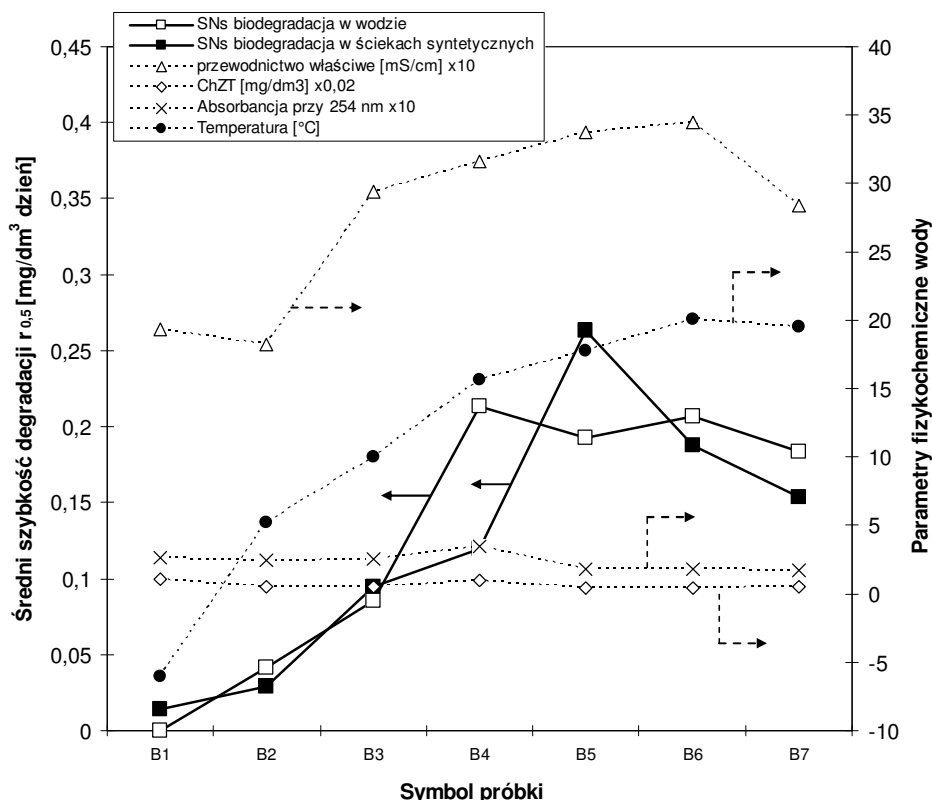


Rys. 3. Średnia szybkość biodegradacji sulfonamidów w badanych próbkach z Czarnej Przemszy i ich właściwości fizykochemiczne

Fig. 3. The average rate of sulfonamides biodegradation in the investigated samples from Czarna Przemsza river and physicochemical properties of samples

Zgodnie z oczekiwaniami stwierdzono, że w próbkach pobieranych od czerwca do sierpnia biodegradacja sulfonamidów zachodziła ze znacznie wyższą szybkością niż w miesiącach zimowych. Istnieje dodatnia korelacja pomiędzy szybkością biodegradacji sulfonamidów a średnią temperaturą miesiąca poprzedzającego pobór próbki. Również incydentalne zanieczyszczenie Czarnej Przemszy (prawdopodobnie osadem czynnym; ChZT wody > 1500 mg O<sub>2</sub>/dm<sup>3</sup>) wpłynęło na intensyfikację procesu biodegradacji. W obu przypadkach przyczyną tego zjawiska jest zwiększona ilość i różnorodność mikroorganizmów w badanych próbkach. Jednak duże różnice uzyskanych wyników dla różnych próbek wskazują, że szacowanie ryzyka środowiskowego na podstawie wyrwykowych badań biodegradowalności może prowadzić do błędnych wniosków. Na przykład analiza środowiskowego oddziaływania sulfonamidów w okresie zimowym nie będzie prawidłowa, jeżeli przeprowadzimy ją na podstawie wyników uzyskanych w okresie letnim. Co prawda zimą przy niskich temperaturach mała aktywność mikroorganizmów sugeruje, że w kontakcie z sulfonamidami ryzyko generowania

lekooporności w tym okresie będzie mniejsze. Jednak z drugiej strony, uwzględniając wysoką ruchliwość tych leków w środowisku, po ich lokalnym wprowadzeniu do biosfery (np. w ściekach z przemysłowej fermy) obszar i czas ich oddziaływania zimą ulegną znacznemu powiększeniu.



Rys. 4. Średnia szybkość biodegradacji sulfonamidów w badanych próbkach z Brynicy i właściwości fizykochemiczne próbek

Fig. 4. The average rate of sulfonamides biodegradation in the investigated samples from Brynica river and physicochemical properties of samples

### Wnioski

Istnieje dodatnia korelacja pomiędzy szybkością biodegradacji sulfonamidów a średnią temperaturą miesiąca poprzedzającego pobór próbki. Istotny wpływ na biodegradację sulfonamidów ma również ich rodzaj oraz incydentalne zanieczyszczenie środowiska. Duże różnice szybkości biodegradacji sulfonamidów w różnych próbkach sugerują, że na podstawie wyrwykowych badań biodegradowalności nie można dokonać prawidłowej oceny ryzyka środowiskowego.

## Literatura

- [1] DANMAP 2011 - 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>.
- [2] Baran W, Adamek E, Ziemiańska J, Sobczak A. *J Hazard Mater.* 2011;196:1-15. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2011.08.082.
- [3] Turkdogan FI, Yetilmezsoy K. *J Hazard Mater.* 2009;166:297-308. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2008.11.012.
- [4] Koschorreck J, Koch C, Ronnefahrt I. *Toxicol Lett.* 2002;131:117-124. DOI: 10.1016/S0378-4274(02)00047-4.
- [5] Andreozzi R, Raffaele M, Nicklas P. *Chemosphere.* 2003;50:1319-1330. DOI: 10.1016/S0045-6535(02)00769-5.
- [6] Klimiuk E, Łebkowska M. *Biotechnologia w ochronie środowiska.* Warszawa: Wyd Nauk PWN; 2004.
- [7] POSEIDON, Assessment of technologies for the removal of pharmaceuticals and personal careproducts in sawage and drinking water facilities to improve the indirect portable water reuse: detailed report, 2005. <http://poseidon.bafg.de/servlet/is/2888/>.
- [8] Lai H-T, Hou J-H. *Aquaculture.* 2008;283:50-55. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2008.07.001.
- [9] Al-Ahmad A, Daschner FD, Kümmerer K. *Arch Environ Contam Toxicol.* 1999;37:158-163. DOI: 10.1007/s002449900501.
- [10] <http://www.katowice.pios.gov.pl/index.php?tekst=monitoring/informacje/i>.
- [11] <http://www.andretti.pl/wxtempdetail.php>.
- [12] Yang S-F, Lin C-F, Lin AY-C, Hong P-KA. *Water Res.* 2011;45:3389-3397. DOI: 10.1016/j.watres.2011.03.052.

## EFFECT OF INOCULUM PROPERTIES ON THE ASSESSMENT OF ANTIMICROBIAL DRUGS SUSCEPTIBILITY TO BIODEGRADATION

<sup>1</sup> Department of General and Inorganic Chemistry, Medical University of Silesia, Sosnowiec

<sup>2</sup> Institute of Occupational Medicine and Environmental Health, Sosnowiec

**Abstract:** The aim of this study was to determine the effect of date (meteorological conditions) and sampling of inoculum on biodegradability of the selected sulfonamides (test was made according to the ISO 9887:1992 (E) procedure) and to compare the results obtained according to the abovementioned procedure with the results of sulfonamides decomposition under aerobic conditions in the real environmental samples (consistent with the samples used to prepare the inoculum). Environmental samples (as well the inoculum) were obtained from the mainstream of Brynica and Czarna Przemsza rivers from 29/02/2012 once a month. In these samples COD, Abs<sub>254nm</sub>, pH, turbidity and conductivity were measured in the sampling day. The duration of the tests was 28 days. It was found a positive correlation between the biodegradation rate of sulfonamides and the average temperature for the month preceding sampling. In addition, a type of sulfonamides used and an incidental pollution of the environment, from which samples were taken, had a significant effect on the biodegradation. However, in some cases the results obtained in the biodegradability test differed significantly from those obtained in the real environmental samples.

**Keywords:** biodegradation, biodegradability, sulfonamides, inoculum