

## WPŁYW WYBRANYCH FARMACEUTYKÓW NA AKTYWNOŚĆ DEHYDROGENAZ OSADU CZYNNEGO

Agnieszka Tomska<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instytut Inżynierii Środowiska, Wydział Infrastruktury i Środowiska, Politechnika Częstochowska, ul. Brzeźnicka 60A, 42-200 Częstochowa, e-mail: atomska@is.pcz.czyst.pl

### STRESZCZENIE

W związku ze wzrastającym zużyciem leków w leczeniu ludzi i zwierząt oraz z niewłaściwymi procedurami ich utylizacji zanieczyszczenie środowiska farmaceutykami wzrasta. Substancje te wraz ze ściekami bytowo-gospodarczymi trafiają do oczyszczalni ścieków. Obecność leków, często opornych na biodegradację, może powodować zakłócenia procesów biologicznego oczyszczania ścieków. Tradycyjne oczyszczalnie ścieków nie są dostosowane do usuwania zanieczyszczeń jakimi są farmaceutyki. Dlatego też część ich wprowadzana jest do odbiorników wodnych wraz z oczyszczonymi ściekami oraz przedostaje się do gleby z osadem. Celem badań było zbadanie wpływu wybranych antybiotyków sulfanilamidu i erytromycyny na zmiany aktywności dehydrogenaz mikroorganizmów osadu czynnego z wykorzystaniem chlorku trifenylotetrazolinowego (testu TTC). Aktywność dehydrogenaz jest wskaźnikiem aktywności biochemicznej mikroorganizmów obecnych w osadzie czynnym czyli zdolności do rozkładu związków organicznych zawartych w ściekach. Test TTC jest szczególnie przydatny w przypadku kontroli prawidłowości przebiegu oczyszczania ścieków, w których obecne są inhibitory reakcji biochemicznych oraz związki toksyczne. Obserwowano spadek aktywności dehydrogenaz osadu czynnego wraz ze wzrostem stężenia badanych antybiotyków. Najniższą wartość aktywności dehydrogenaz równą  $32,4 \mu\text{mol TF/g}_{\text{sm}}$  otrzymano przy stężeniu sulfanilamidu  $150 \text{ mg/l}$ . Dla tej próbki stopień inhibicji wyniósł 31%.

**Słowa kluczowe:** aktywność dehydrogenaz, test TTC, osad czynny, sulfanilamid, erytromycyna

## INFLUENCE OF SELECTED PHARMACEUTICALS ON ACTIVATED SLUDGE DEHYDROGENASE ACTIVITY

### ABSTRACT

Due to the increasing consumption of pharmaceuticals for the treatment of humans and animals as well as inadequate procedures for the disposal of pharmaceuticals into environmental, pollution caused by them is increasing. Generally these substances are introduced to the wastewater treatment plant with municipal wastewater. They are often resistant to biodegradation and can cause to the disruption in biological wastewater treatment processes. Traditional water treatment plants are not designed to remove pharmaceutical contaminants. Therefore, part of it are introduced into water bodies with treated wastewater and next into the soil through sludge disposal. The aim of this work was to evaluate the effect of selected antibiotics – sulfanilamide and erythromycin on activated sludge dehydrogenase activity with use of trifenyltetrazolinum chloride (TTC test). Dehydrogenases activity is an indicator of biochemical activity of microorganisms present in activated sludge or the ability to degrade organic compounds in waste water. TTC test is particularly useful for the regularity of the course of treatment, in which the presence of inhibitors of biochemical reactions and toxic compounds are present. It was observed that the dehydrogenase activity decreases with the increase of a antibiotics concentration. The lowest value of the dehydrogenase activity equal to  $32.4 \mu\text{mol TF/g}_{\text{MLSS}}$  obtained at sulfanilamide concentration  $150 \text{ mg/l}$ . For this sample, an inhibition of dehydrogenase activity was 31%.

**Keywords:** dehydrogenase activity, TTC test, activated sludge, sulfanilamide, erythromycin

## WPROWADZENIE

W ostatnich latach w związku ze zwiększeniem produkcji farmaceutyków, z powszechnym ich stosowaniem w leczeniu ludzi i zwierząt oraz z niewłaściwymi procedurami ich utylizacji obserwuje się zwiększone zainteresowanie zagrożeniami związanymi z obecnością tych substancji w środowisku przyrodniczym. Zużycie poszczególnych grup leków w ciągu roku waha się w różnych krajach od kilkudziesięciu do kilkuset ton [Fent i in 2006], a roczne zużycie antybiotyków na całym świecie wynosi 200 tysięcy ton [Lindberg i in. 2004]. Zgodnie z danymi firm KPMG i PMR polski rynek sprzedaży farmaceutyków zajmuje 6 miejsce w Europie, a pod względem dynamiki wzrostu sprzedaży nasz kraj plasuje się na 2 miejscu za Hiszpanią [Szymonik i Lach 2012].

Głównymi źródłami zanieczyszczeń antybiotykami środowisk przyrodniczych są ścieki komunalne, szpitalne, z zakładów farmaceutycznych, pochodzące z gospodarstw hodowlanych oraz obiektów weterynaryjnych [Baquero i in. 2008, Czech 2012]

Obecność tych leków stwierdza się w różnych stężeniach w ściekach szpitalnych i komunalnych, w ściekach oczyszczonych oraz w wodach powierzchniowych [Kümmerer 2004]. Rozprzestrzenianie się antybiotyków w środowiskach przyrodniczych sprzyja rozwojowi mikroorganizmów lekoopornych [Łebkowska 2009, Zabłotni i Jaworski 2014].

Większość antybiotyków obecnych w ściekach, często opornych na biodegradację, może powodować zakłócenia procesów biologicznego oczyszczania ścieków [Michael i in. 2013]. Oczyszczalnie ścieków, nawet te nowoczesne, nie są dostosowane do usuwania zanieczyszczeń jakimi są antybiotyki. Dlatego też część ich wprowadzana jest do odbiorników wodnych wraz z oczyszczonymi ściekami oraz przedostaje się do gleby z osadem. Wśród najczęściej wymienianych grup antybiotyków obecnych w wodach powierzchniowych stanowiących zagrożenie dla

środowiska naturalnego możemy wyróżnić grupy sulfonamidów, makrolidów oraz fluorochinolony [Szymonik i Lach 2012, Czech 2012].

Jedną z metod pomiaru aktywności biologicznej mikroorganizmów biorących udział w biologicznym procesie usuwania zanieczyszczeń jest pomiar aktywności dehydrogenaz z wykorzystaniem testu TTC. Test ten jest szczególnie przydatny w przypadku kontroli prawidłowości przebiegu oczyszczania ścieków, w których obecne są inhibitory reakcji biochemicznych oraz związki toksyczne [Miksch 1983]. Wyniki badań Richa i in. [Rich i in. 2001] wskazują na zasadność wyboru testu TTC do charakteryzowania biochemicznych przemian w osadzie czynnym.

Celem pracy było określenie wpływu wybranych przedstawicieli dwóch grup antybiotyków - sulfanilamidu i erytromycyny na aktywność dehydrogenaz osadu czynnego z wykorzystaniem testu TTC.

## METODYKA BADAŃ

Wpływ wybranych antybiotyków sulfanilamidu i erytromycyny na biochemiczne właściwości osadu czynnego badano przez porównanie aktywności dehydrogenaz osadu czynnego po wprowadzeniu określonej ilości antybiotyku, z aktywnością dehydrogenaz osadu czynnego bez jego dodatku. Doświadczenia przeprowadzono przy stężeniach sulfanilamidu 10, 20, 50, 100 i 150 mg/l oraz stężeniu erytromycyny 10, 50, 100 i 150 mg/l. Podstawowe informacje dotyczące wybranych antybiotyków sulfanilamidu i erytromycyny przedstawiono w tabeli 1.

Badania prowadzono stosując osad czynny pochodzący z Centralnej Oczyszczalni Ścieków „Warta” w Częstochowie. Oczyszczanie ścieków w tej oczyszczalni odbywa się metodą biologiczno - chemiczną z wykorzystaniem osadu czynnego w wielofunkcyjnych reaktorach biologicznych (utlenianie związków organicznych, nityfikacja, denityfikacja i biologiczna

**Tabela 1.** Charakterystyka antybiotyków zastosowanych w badaniach

**Table 1.** Characteristics of antibiotics used in the study

Nazwa antybiotyku	Wzór sumaryczny	Grupa antybiotyku	Masa molowa, g/mol	Gęstość, g/cm <sup>3</sup>	Rozpuszczalność	
					w wodzie, g/l	w etanolu
Sulfanilamid	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	sulfonamidy	172,21	1,08	7,5	dość trudno
Erytromycyna	C <sub>37</sub> H <sub>67</sub> N <sub>13</sub> O <sub>13</sub>	makrolidy	733,93	1,226	1,44 · 10 <sup>-3</sup>	łatwo

defosfatacja). Osad czynny o stężeniu zawiesin  $6,4 \text{ g/dm}^3$  pobrano bezpośrednio z komory nitryfikacyjnej. Zawiesiny ogólne oznaczono zgodnie z [Hermanowicz 1999].

### Oznaczenie aktywności dehydrogenaz testem TTC

Ocenę aktywności biochemicznej osadu czynnego przeprowadzono na podstawie badania aktywności dehydrogenaz - enzymów katalizujących utlenianie substancji organicznych, które polega na odwodorowaniu substratów [Hermanowicz 1999, Miksch 1983]. Reakcja odwodorowania przez te enzymy zachodzi w trakcie inkubacji w określonej temperaturze, czasie i przy odpowiednim odczynie. W badaniach wykorzystano chlorek trifenyloformazolu (TTC), który w reakcjach katalizowanych przez dehydrogenazy ulega redukcji do trifenyloformazanu (TF). TF ma barwę czerwoną. Intensywność czerwonego zabarwienia badanej próbki jest wprost proporcjonalna do pierwotnej ilości dehydrogenaz w osadzie czynnym. Reakcję odwodorowania zatrzymuje się alkoholem. Absorbancje zabarwionych próbek oznaczono spektrofotometrycznie przyjmując za miarę aktywności dehydrogenaz stężenie wytworzonego TF.

Przed wykonaniem oznaczeń testem TTC osad czynny przesączono przez miękki sączek, kilkakrotnie przemyto wodą destylowaną. Osad z sączka spłukano ilościowo i następnie dopełniono do objętości pobranego osadu. W każdej badanej próbce użyto po 5 ml tak przygotowanego osadu. Pozostałe roztwory do osadu czynnego wprowadzono w ilościach podanych w tabeli 2.

W pierwszej kolejności do osadu czynnego wprowadzono roztwór sulfanilamidu kolejno o stężeniach 10, 20, 50, 100 i 150 mg/l oraz erytromycyny o stężeniach 10, 50, 100 i 150 mg/l. Do próbek bez antybiotyku wprowadzono wodę

destylowaną. Następnie roztwory dokładnie wymieszano i odczekano 30 minut. Do wszystkich próbek dodano bufor Tris-HCl, szybko ogrzano do temperatury  $37^\circ\text{C}$  i następnie dodano roztwór TTC i glukozy do wszystkich próbek poza próbką ślepa, do której dodano wodę destylowaną. Wszystkie próbki dokładnie wymieszane ponownie umieszczono w łaźni wodnej i inkubowano w ciemności w temperaturze  $37^\circ\text{C}$ . Po 30 minutach reakcję zatrzymano dopełniając alkoholem metylovym do objętości 25 ml. Probki przesączono do kolb miarowych i dopełniono alkoholem metylovym do objętości 50 ml. Zmierzono absorbancję przy długości fali 490 nm wszystkich badanych próbek i odczytano w z krzywej wzorcowej stężenie TF. Dla każdej badanej próbki wykonano trzy powtórzenia.

Po wyznaczeniu wartości TF obliczono aktywność dehydrogenaz zgodnie ze wzorem (1). Za wynik aktywności dehydrogenaz przyjęto iloraz stężenia TF do zawartości zawiesin ogólnych.

$$AD = \frac{TF \cdot 1000}{V \cdot Z}, \text{ } \mu\text{mol TF/g}_{\text{sm}} \quad (1)$$

Gdzie: TF – stężenie trifenyloformazanu w próbce osadu czynnego,  $\mu\text{mol TF}$   
 V – objętość osadu czynnego użyta do oznaczenia,  $\text{cm}^3$   
 Z – zawiesina ogólna,  $\text{g/dm}^3$

Procentowy spadek aktywności dehydrogenaz wywołany przez wybrane antybiotyki dla wszystkich próbek osadu czynnego określono na podstawie stopnia inhibicji – wzór (2). Stopień inhibicji aktywności dehydrogenaz wyrażono jako procentowy spadek wartości aktywności dehydrogenaz bez dodatku antybiotyku w odniesieniu do aktywności dehydrogenaz osadu czynnego oznaczonej w obecności sulfanilamidu lub erytromycyny.

**Tabela 2.** Objętości roztworów dodawanych do próbki osadu czynnego

**Table 2.** Volumes of solutions added to the sludge samples

Próbka	Osad czynny	Roztwór sulfonamidu lub erytromycyny	Woda destylowana	Bufor Tris-HCl	Roztwór TTC i glukozy	Woda destylowana
	ml					
Ślepa	5	–	2	5	–	1
Bez antybiotyku	5	–	2	5	1	–
Z antybiotykiem	5	2	–	5	1	–

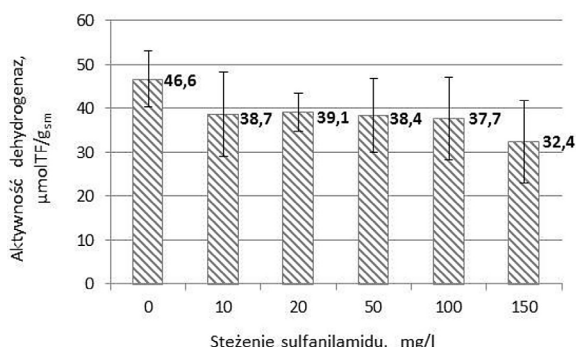
$$I_{AD} = \frac{AD_0 - AD_x}{AD_0} \cdot 100\%, \% \quad (2)$$

gdzie:  $AD_0$  – aktywność dehydrogenaz bez dodatku antybiotyku,  $\mu\text{mol TF/g}_{\text{sm}}$   
 $AD_x$  – aktywność dehydrogenaz osadu czynnego w obecności sulfanilamidu lub erytromycyny,  $\mu\text{mol TF/g}_{\text{sm}}$

## WYNIKI BADAŃ

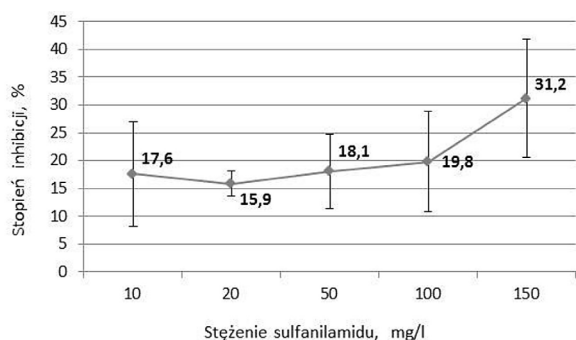
Biochemiczne przemiany w osadzie czynnym pod wpływem wybranych antybiotyków - sulfanilamidu i erytromycyny obserwowano na podstawie testu TTC. Bazowa aktywność dehydrogenaz bez dodatku antybiotyku wynosiła  $46,6 \mu\text{mol TF/g}_{\text{sm}}$ .

Zmiany aktywności dehydrogenaz osadu czynnego pod wpływem sulfanilamidu obserwowano przy jego stężeniach w próbkach osadu 10, 20, 50, 100 i 150 mg/l. Na rysunku 1 zestawiono



Rys. 1. Wpływ sulfanilamidu na aktywność dehydrogenaz osadu czynnego

Fig. 1. The effect of the sulfanilamide on activated sludge dehydrogenase activity

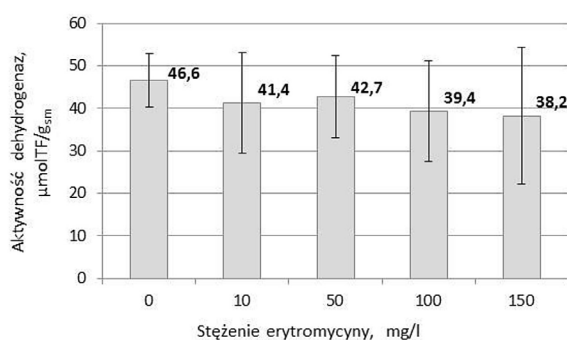


Rys. 2. Zmiany stopnia inhibicji aktywności dehydrogenaz pod wpływem sulfanilamidu

Fig. 2. Changes of the inhibition of dehydrogenase activity by sulfanilamide

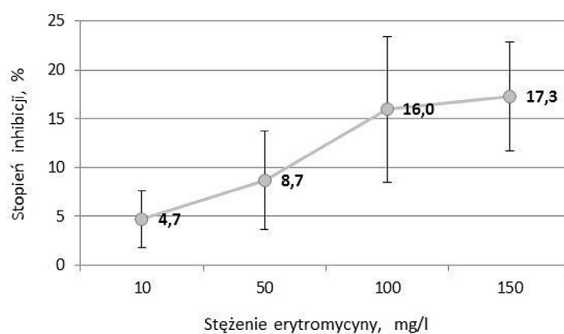
zmiany aktywności dehydrogenaz osadu czynnego pod wpływem różnych stężeń badanego sulfanilamidu. Obserwowano tendencję spadkową aktywności dehydrogenaz wraz ze wzrostem stężenia sulfanilamidu. Dla stężenia 150 mg/l aktywność dehydrogenaz zmalała 1,4 razy w zestawieniu z wartością bazową do wartości  $32,4 \mu\text{mol TF/g}_{\text{sm}}$ . Stopień inhibicji wyznaczony za pomocą równania (2) dla tego stężenia sulfonamidu wyniósł 31%. Rysunek 2 pokazuje zmiany stopnia inhibicji badanej aktywności dla wybranych stężeń sulfanilamidu.

Stężenie erytromycyny w próbkach w trakcie badania jej wpływu na aktywność dehydrogenaz wynosiło kolejno 10, 50, 100 i 150 mg/l. Również erytromycyna powodowała obniżenie aktywności dehydrogenaz osadu czynnego wraz ze wzrostem stężenia tego antybiotyku. Wpływ erytromycyny na aktywność dehydrogenaz osadu czynnego pokazano na rysunku 3. Stężenie erytromycyny na poziomie 150 mg/l w próbce osadu czynnego przyczyniło się do zmniejszenia aktywności de-



Rys. 3. Wpływ erytromycyny na aktywność dehydrogenaz osadu czynnego

Fig. 3. The effect of the sulfanilamide on activated sludge dehydrogenase activity



Rys. 4. Zmiany stopnia inhibicji aktywności dehydrogenaz pod wpływem erytromycyny

Fig. 4. Changes of the inhibition of dehydrogenase activity by sulfanilamide

hydrogenaz do wartości  $38,2 \mu\text{mol TF/g}_{\text{sm}}$ . W tej próbce osadu odnotowano spadek aktywności dehydrogenaz względem aktywności, uzyskanej w próbce bez antybiotyku o 17%. Na rysunku 4 przedstawiono zależność stopnia inhibicji aktywności dehydrogenaz od stężenia erytromycyny.

## WNIOSKI

1. Obserwowano spadek aktywności dehydrogenaz osadu czynnego wraz ze wzrostem stężenia sulfanilamidu i erytromycyny.
2. Najniższą wartość aktywności dehydrogenaz równą  $32,4 \mu\text{mol TF/g}_{\text{sm}}$  otrzymano przy stężeniu sulfanilamidu 150 mg/l. Dla tej próbki stopień inhibicji wyniósł 31%.

## Podziękowania

Badania zrealizowano w ramach projektu BS-PB-401/301/12.

## PIŚMIENNICTWO

1. Baquero F., Martinez J-L., Canton R.: Antibiotic and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*, 2008, 19, 260–265.
2. Czech B.: Usuwanie farmaceutyków z wód i ścieków z wykorzystaniem metod adsorpcyjnych i fotokatalitycznych, *Adsorbenty i Katalizatory – Wybrane Technologie a Środowisko*, Rzeszów 2012, 2, 453–466.
3. Fent K., Weston A.A., Caminada D., *Ecotoxicology of human pharmaceuticals*, *Aquat. Toxicol.*, 2006, 76, 122–159.

4. Hermanowicz W., Dojlido J., Dożańska W., Kozirowski B., Zerbe J. *Fizyko-chemiczne badanie wody i ścieków*. Wydawnictwo Arkady. Warszawa 1999.
5. Kümmerer K.: Resistance in the environment. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2004, Aug; 54, 2, 311–320.
6. Łebkowska M., Występowanie bakterii antybiotykoopornych w wodzie przeznaczonej do spożycia przez ludzi. *Ochrona Środowiska*, 2009, 31, 2, 11–15.
7. Lindberg R., Jarnheimer P.A., Olsen B., Johansson M., Tysklind M., Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standard, *Chemosphere*, 2004, 57, 1479–1488.
8. Michael I, Rizzo L, McArdell C, Manaia C, Merlin C, Schwartz T, et al. Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: A review *Water Res.*, 2013, 47, 957–995.
9. Miksch K., Aktywność fizjologiczna drobnoustrojów w procesie osadu czynnego, *Zeszyty Naukowe Politechniki Śląskiej Nr 753, Gliwice* 1983.
10. Rich P.R., Mischis L.A., Purton S., Wiskich J.T., The sites of interaction of triphenyltetrazolium chloride with mitochondrial respiratory chains, *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 202, 181–187.
11. Szymonik A., Lach J., Zagrożenia środowiska wodnego obecnością środków farmaceutycznych, *Inżynieria i Ochrona Środowiska* 2012, 15, 249–263.
12. Szymonik A., Lach J.: Obecność farmaceutyków w wodach powierzchniowych i przeznaczonych do spożycia, *Proceedingd of ECOpole*, 2013 ,7, 2, 735–743.
13. Zabłotni A, Jaworski A, Źródła antybiotyków w środowiskach naturalnych i ich rola biologiczna, *Postepy Hig Med Dosw (online)*, 2014, 68, 1040–1049.