

EWA FELIS

Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska, Politechnika Łódzka, Łódź
Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki, Politechnika Śląska, Gliwice

STANISŁAW LEDAKOWICZ

Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska, Politechnika Łódzka, Łódź

KORNELIUSZ MIKSCH

Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki, Politechnika Śląska, Gliwice

Zmiany biochemicznych właściwości osadu czynnego pod wpływem niesteroidowych leków przeciwzapalnych

Wprowadzenie

Informacje dotyczące występowania farmaceutyków i innych substancji aktywnych biologicznie w środowisku naturalnym docierają do prasy fachowej niemal z całego świata [1, 2]. Jako główne źródło zanieczyszczeń środowiska lekami wymieniane są ścieki bytowo-gospodarcze, do których, głównie wraz wydalninami, przedostają się niecałkowicie zmetabolizowane leki. Ze względu na fakt, iż większość leków wydalana jest z organizmu z moczem, pojawiają się koncepcje dotyczące usuwania farmaceutyków bezpośrednio z uryny. Zagadnienia usuwania farmaceutyków z uryny są ściśle powiązane z tematem toalet separujących (*no-mix toilet*), czyli takich toalet, w których występuje możliwość separacji moczu np. [3]. Toalety separujące pozwalają na „odzysk” z moczu związków azotu czy fosforu, z możliwością dalszego ich wykorzystania, np. rolniczo. Ze względu na wysokie obciążenie ładunkiem azotu, mocz jest substancją, którą stosunkowo trudno usunąć za pomocą klasycznych metod osadu czynnego, niemniej jednak istnieją dowody na efektywny rozkład uryny w procesie nityfikacji [4]. W moczu stężenie niezmetabolizowanych leków z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) może wynosić nawet od kilku do kilkunastu mg/dm³. Ze względu na toksyczne lub szkodliwe działanie NLPZ na organizmy wskaźnikowe (np. *Lemna minor*) można przypuszczać, iż obecne w moczu leki mogą w znacznym stopniu przyczynić się do inhibicji procesu biologicznego oczyszczania uryny [5]. Celem niniejszej pracy jest określenie wpływu wybranych NLPZ na biochemiczne właściwości osadu czynnego, hodowanego w sposób ciągły w napowietrzonym reaktorze przepływowym. Do tego celu wytypowano test TTC, który odzwierciedla aktywność heterotroficznych mikroorganizmów osadu czynnego.

Metodyka badań

Wybrane do badań substancje, a mianowicie: diklofenak, naproksen i ibuprofen, są typowymi przedstawicielami NLPZ. Podstawowe informacje dotyczące wytypowanych NLPZ zostały przedstawione w tablicy 1. Standardy leków wykorzystywane podczas niniejszych badań zostały zakupione w firmie *Sigma Aldrich*.

Tablica 1
Podstawowe informacje dotyczące diklofenaku, naproksenu i ibuprofenu

Parametr	Naproksen	Ibuprofen	Diklofenak
Wzór sumaryczny	C ₁₄ H ₁₄ O ₃	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	C ₁₆ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂
Masa molowa, [g/mol]	230,26	206,28	296,16
Nr CAS	22204-53-1	15687-27-1	15307-86-5
K _d , [dm ³ /kg]	217	7	16

Badania dotyczące zmian biochemicznych właściwości osadu czynnego prowadzone były na mikroorganizmach hodowanych w napowietrzonym reaktorze biologicznym (z nityfikacją). Osad do badań pochodził z jednej ze śląskich oczyszczalni ścieków i w warunkach laboratoryjnych adaptowany był tak, aby jego wiek wynosił 8 dni.

Wpływ wybranych farmaceutyków na biochemiczne właściwości osadu czynnego określano przez porównanie aktywności enzymatycznej osadu czynnego po wprowadzeniu określonej dawki leku, z aktywnością enzymatyczną osadu czynnego bez dodatku leku (tzw. aktywność podstawowa). Aktywność enzymatyczna mikroorganizmów wyznaczana była jako aktywność dehydrogenaz, za pomocą testu z chlorkiem 2,3,5-trójfenylotetrazolowym (tzw. test TTC). Aktywność dehydrogenaz oznaczana była jako przyrost trójfenyloformazanu (TF) w czasie, w przeliczeniu na suchą masę osadu czynnego. Test TTC i zabiegi wstępne wykonywane były zgodnie z metodyką opisaną w literaturze [6]. Dawki leków stosowane w eksperymencie były dobrane tak, aby po ich wprowadzeniu do próbek z osadem czynnym i innymi reagentami, ich stężenia zmieniały się w przedziałach 0–6,0 mg/dm³ (naproksen), 0–2,0 mg/dm³ (diklofenak) oraz 0–1,7 mg/dm³ (ibuprofen). Efekt wpływu wybranych leków na organizmy osadu czynnego określano jako stopień toksyczności, liczony wg wzoru (1):

$$ST = \frac{AD_0 - AD_T}{AD_0} \quad (1)$$

gdzie: *ST* – stopień toksyczności (bezwymiarowy), *AD*₀ – podstawowa aktywność dehydrogenaz, mg TF/h · g_{sm}, *AD*_T – aktywność dehydrogenaz po dodaniu określonej dawki substancji toksycznej, mg TF/h · g_{sm}.

Na podstawie otrzymanych wyników wyznaczano maksymalny stopień toksyczności (ST_{MAX}), jaki może powodować badany farmaceutyk działając na określoną populację mikroorganizmów oraz wartość stałej K , którą można zdefiniować jako „stężenie substancji toksycznej, przy którym stopień toksyczności jest równy połowie toksyczności maksymalnej”. Szczegółowa procedura obliczania parametrów K i ST_{MAX} przedstawiona została w pracy doktorskiej [7]. Wyznaczone wartości parametrów ST_{MAX} i K , posłużyły do wyznaczenia teoretycznych stopni toksyczności

$$ST_{TR} = ST_{MAX} \frac{C_T}{C_T + K} \quad (2)$$

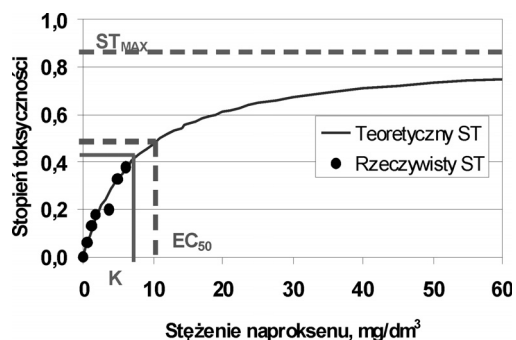
gdzie: ST_{TR} – teoretyczny (obliczeniowy) stopień toksyczności, ST_{MAX} – maksymalny stopień toksyczności, K – stała, [mg/dm³], C_T – stężenie substancji toksycznej, [mg/dm³]

Wzór (2) pozwala również na obliczenie parametru EC_{50} ($ST_{TR} = 0,5$), to znaczy takiego stężenia substancji toksycznej, przy którym teoretyczny stopień toksyczności osiąga wartość 0,5.

Wyniki badań

Zmiany biochemicznych właściwości osadu czynnego pod wpływem **naproksenu** obserwowano przy jego stężeniach w próbkach od 0 do 6,0 mg/dm³. Podstawowa aktywność dehydrogenaz (dla stężenia naproksenu w próbce = 0 mg/dm³) wynosiła 2,09 mg TF/h · g_{sm}. Przy dawce naproksenu równej 6 mg/dm³, aktywność dehydrogenaz spadła do wartości 1,30 mg TF/h · g_{sm}. Stopień toksyczności, wyznaczony za pomocą równania (1), dla tej dawki naproksenu wynosił 0,38. Obliczone dla każdego z badanych stężeń naproksenu stopnie toksyczności pozwoliły na wyznaczenie wartości parametrów ST_{MAX} i K . W przypadku naproksenu parametr ST_{MAX} osiągnął wartość równą 0,85, co oznacza, że naproksen jako substancja toksyczna może powodować obniżenie aktywności dehydrogenaz o maksimum 85% względem aktywności podstawowej. Wartość parametru K dla naproksenu wyniosła 7,7 mg naproksenu/dm³ (dla stopnia toksyczności równego 0,425). Na podstawie wzoru (2) obliczono wartość parametru EC_{50} dla naproksenu jako równą 11,1 mg naproksenu/dm³ (Tabl. 2.). Na rys. 1 przedstawiono zależności stopnia toksyczności od stężenia naproksenu.

Stężenia **ibuprofenu** w próbkach, podczas badania jego wpływu na mikroorganizmy osadu czynnego, zmieniały się w przedziale od 0 do 1,7 mg/dm³. Podstawowa aktywność de-



Rys. 1. Zależności stopnia toksyczności od stężenia naproksenu
 $ST_{MAX} = 0,85$; $K = 7,7$ mg naproksenu/dm³;
 $EC_{50} = 11,1$ mg naproksenu/dm³

$$\left(ST_{TR} = 0,85 \frac{C_T}{C_T + 7,7} \right)$$

Tablica 2
 Podstawowe parametry określające oddziaływanie wybranych NLPZ na mikroorganizmy osadu czynnego

Substancja	ST_{MAX}	K , [mg/dm ³]	EC_{50} , [mg/dm ³]
Ibuprofen	0,70	4,9	12,3
Diklofenak	0,76	3,5	6,7
Naproksen	0,85	7,7	11,1

hydrogenaz osadu czynnego wynosiła 1,36 mg TF/h · g_{sm}. Stężenie ibuprofenu w próbce na poziomie 1,70 mg/dm³ powodowało zmniejszenie aktywności dehydrogenaz do wartości 0,95 mg TF/h · g_{sm}. Obliczona wartość parametru EC_{50} dla ibuprofenu wynosiła 12,3 mg ibuprofenu/dm³ (w przeliczeniu na gram suchej masy osadu to 6,2 mg ibuprofenu/g_{smo}). Na podstawie obliczeń, można stwierdzić, że maksymalny stopień toksyczności, który powoduje ibuprofen działając na badaną populację mikroorganizmów osadu czynnego, wynosi 0,7.

Początkowa aktywność dehydrogenaz, podczas badania wpływu **diklofenaku** na mikroorganizmy osadu czynnego wynosiła 3,32 mg TF/h · g_{sm}. Obliczona dla diklofenaku wartość parametru EC_{50} wynosiła 6,7 mg/dm³ (w przeliczeniu na gram suchej masy osadu – 3,4 mg diklofenaku/g_{smo}). Odnosząc tą wartość do uzyskanych wartości EC_{50} ibuprofenu i naproksenu, można stwierdzić, że diklofenak jest najbardziej toksycznym farmaceutykiem z wybranej grupy NLPZ, gdyż dużo niższe stężenie (prawie 1,8 razy niższe porównując z ibuprofenem i 1,7 razy niższe w porównaniu z naprokse- nem) powodowało spadek aktywności podstawowej do wartości $ST = 0,5$. W tablicy 2 zestawiono podstawowe parametry, określające oddziaływanie wybranych NLPZ na mikroorganizmy osadu czynnego.

Podsumowanie i wnioski

Odnosząc uzyskane wartości parametrów EC_{50} badanych związków do parametrów określonych dyrektywą UE 92/32/EEC, w której substancje o EC_{50} z zakresu 1–10 mg/dm³ klasyfikowane są jako toksyczne, natomiast substancje o EC_{50} z zakresu 10–100 mg/dm³ klasyfikowane są jako szkodliwe dla organizmów testowych, można stwierdzić, że diklofenak ($EC_{50} = 6,7$ mg/dm³) wywiera działanie toksyczne względem badanych kultur mikroorganizmów osadu czynnego, a ibuprofen ($EC_{50} = 12,3$ mg/dm³) i naproksen ($EC_{50} = 11,1$ mg/dm³) wykazują działanie szkodliwe. Należy jednak pamiętać o fakcie, że w moczu (szczególnie w moczu zbieranym w toaletach separujących, np. w szpitalach) rzadko kiedy mamy do czynienia z pojedynczym związkiem, tylko z mieszaniną leków, gdzie efekt toksyczny (bądź szkodliwy) może być potęgowany obecnością innych substancji.

Niniejsza praca jest częściowo finansowana z grantu nr PZB/MNiSW/07/2006/31.

LITERATURA

1. T. Ternes: Water Res. **32**, 3245 (1998).
2. K. Kuemmerer: Pharmaceuticals in the environment – sources, fate, effects and risk. Berlin, Heidelberg, New York, Springer, 2004.
3. T. Ternes, A. Joss (red.): Human pharmaceuticals, hormones and fragrances. The challenge of micropollutants in urban water management. London, New York, IWA Publishing, 2006.
4. T. Larsen, J. Lienert, A. Joss, H. Siegest: J Biotechnol. **113**, 295 (2004).
5. M. Cleuvers: Toxicol. Lett. **142**, 185 (2003).
6. K. Miksch: Vom Wasser **64**, 187 (1985).
7. E. Felis: Praca doktorska, Politechnika Śląska (2006).