

Wojciech BARAN¹, Ewa ADAMEK¹, Justyna ZIEMIAŃSKA², Andrzej MAKOWSKI¹
i Andrzej SOBCZAK^{1,2}

ZMIANY EKOTOKSYCZNOŚCI ROZTWORÓW ZAWIERAJĄCYCH SULFONAMIDY W TRAKCIE PROCESU ZAAWANSOWANEGO UTLENIANIA

CHANGES IN ECOTOXICITY OF SULFONAMIDES SOLUTIONS DURING THE ADVANCED OXIDATION PROCESS

Abstrakt: Procesy zaawansowanego utleniania (AOP) są często wykorzystywane do degradacji zanieczyszczeń odpornych na biodegradację i silnie toksycznych. Przykładem takich substancji są sulfonamidy zaliczane do syntetycznych chemioterapeutyków o działaniu bakteriostatycznym. Aby zastosowanie procesów AOP było uzasadnione, ważne jest, by ich produkty charakteryzowały się niższą ekotoksycznością niż substraty. Celem pracy była ocena ekotoksyczności sulfanilamidu i sulfametoksazolu oraz produktów reakcji ich utleniania za pomocą rodników hydroksylowych (HO[•]). Źródłem rodników była reakcja fotokatalityczna prowadzona w obecności TiO₂. Ocenę ekotoksyczności wykonywano, wykorzystując standaryzowany test MARA[®] i procedury jego producenta. Test ten wykorzystuje jako bioindykatory dziesięć wyizolowanych szczepów bakteryjnych i drożdże. Stwierdzono, że większość bioindykatorów była praktycznie niewrażliwa na badane sulfonamidy do stężenia 500 μmol dm⁻³. Mikroorganizmami wrażliwymi w znacznie większym stopniu od pozostałych były szczepy *Microbacterium* spp. oraz *Citrobacter freundii*. Minimalne stężenia hamujące wyznaczone względem tych szczepów dla sulfanilamidu i sulfametoksazolu wynosiły odpowiednio 15 μmol dm⁻³ (*Microbacterium* spp.) i 19 μmol dm⁻³ (*C. freundii*). Stwierdzono również, że wypadkowy efekt inhibicyjny badanych próbek malał w trakcie trwania AOP, jednak znacznie wolniej niż towarzysząca mu degradacja sulfonamidów. Najsilniej efekt ten obserwowany był u mikroorganizmów bardziej wrażliwych na sulfonamidy. Jednak w pojedynczych przypadkach w trakcie AOP obserwowano również wzrost inhibicji w badanych roztworach.

Słowa kluczowe: sulfonamidy, ekotoksyczność, procesy zaawansowanego utleniania

Jednym z negatywnych skutków zachodzącego obecnie rozwoju cywilizacyjnego jest wzrost ilości antropogennych zanieczyszczeń wprowadzanych do środowiska. Jako szczególnie niebezpieczne uznaje się substancje, które charakteryzuje jednocześnie występowanie następujących cech:

- duża trwałość i odporność na procesy rozkładu zachodzące w środowisku,
- wysoka aktywność biologiczna, np. toksyczność, mutagenność, ekotoksyczność,
- zdolność do akumulacji w łańcuchach pokarmowych,
- zdolność do łatwego rozprzestrzeniania się w środowisku,
- duża i wciąż rosnąca konsumpcja.

Przykładem substancji, których nadmierna, szybko rosnąca konsumpcja w ostatnich latach budzi szczególny niepokój, są - używane w hodowli zwierząt - sulfonamidy [1-4]. Ich pozostałości (lub metabolity), trafiając do środowiska, stają się promotorami lekooporności [1, 4]. Opinie dotyczące skuteczności stosowanych technologii usuwania tych leków ze strumienia odpadów są rozbieżne [1, 5, 6]. Najczęściej stosowanym

¹ Zakład Chemii Ogólnej i Nieorganicznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec, tel. 32 364 15 62, email: bw-xxl@wp.pl

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

kryterium oceny badanej metody jest wyłącznie uzyskiwany z jej pomocą stopień usunięcia leku lub jego mineralizacji [1, 6].

Ze względu na możliwość generowania lekooporności przez substancje przeciwbakteryjne obecne w niezupełnie oczyszczonych ściekach jako bardziej właściwy sposób oceny zastosowanej metody wydaje się wyznaczanie aktywności mikrobiologicznej tych ścieków przed i po oczyszczaniu.

Do degradacji zanieczyszczeń odpornych na biodegradację i silnie toksycznych często wykorzystywane są *procesy zaawansowanego utleniania* (AOP) [1, 7, 8]. Jednak, aby zastosowanie procesów AOP było uzasadnione, ważne jest, by ich produkty charakteryzowały się niższą ekotoksycznością niż substraty.

Celem pracy była ocena ekotoksyczności wybranych sulfonamidów oraz produktów reakcji ich utleniania za pomocą rodników hydroksylovych (HO^\bullet), generowanych w trakcie reakcji fotokatalitycznej.

Metodyka badań

W badaniach, jako substancje wzorcowe wykorzystywano roztwory wodne sulfanilamidu (cz.d.a. POCH) i sulfametoksazolu (99%, Sigma). O wyborze tych leków zdecydowało ich wysokie zużycie oraz duża frekwencja w próbkach środowiskowych.

Reakcję fotokatalityczną prowadzono w wodnych roztworach badanych sulfonamidów ($C_o = 0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$) po dodaniu stałego $\text{TiO}_2\text{-P25}$ (Aeroxide) w ilości $0,5 \text{ g dm}^{-3}$. Tak spreparowane mieszaniny naświetlano promieniowaniem UV A o natężeniu $13,6 \text{ W m}^{-2}$. Próbkę uzyskano przed rozpoczęciem naświetlania oraz po jego określonym czasie odwirowywano (20 min, 4000 RPM), a następnie poddawano ocenie ich aktywność mikrobiologiczną z użyciem standardowego testu MARA® i procedury opisanej przez producenta [9].

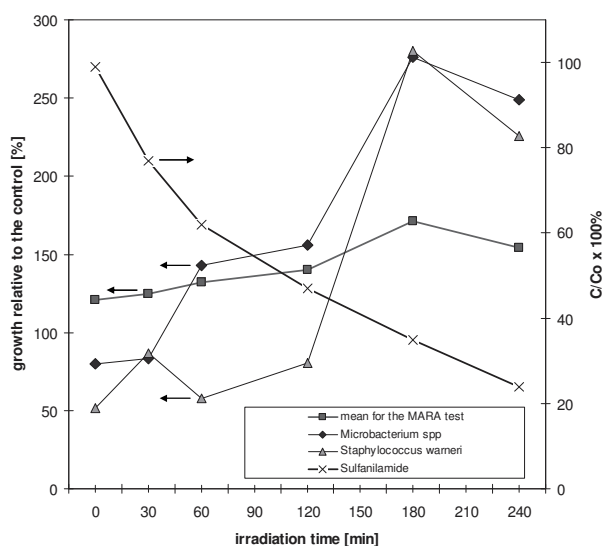
Jest to system oceny aktywności mikrobiologicznej próbek na podstawie obserwacji zmian wzrostu bakterii *Microbacterium* spp, *Brevundimonas diminuta*, *Citrobacter freudii*, *Comamonas testosterone*, *Enterococcus casseliflavus*, *Delftia acidovorans*, *Kurthia gibsonii*, *Staphylococcus warneri*, *Pseudomonas aurantiaca*, *Serratia rubidaea* oraz drożdży *Pichia anomalia* [10]. Wzrost próbek kontrolnych przyjęto za 100%. W celach porównawczych z użyciem testu MARA wyznaczano również *minimalne stężenia hamujące* (MTC) dla badanych sulfonamidów. Maksymalne stężenia badanych sulfonamidów w teście wynosiły $500 \mu\text{mol dm}^{-3}$. Testy powtarzano trzykrotnie.

Omówienie wyników i dyskusja

W trakcie badań wstępnych potwierdzono, że podczas naświetlania próbek zachodzi obniżanie stężenia zawartych w nich sulfonamidów. Świadczy to o zachodzącym ich rozkładzie. Dynamikę tego procesu przedstawiono na rysunkach 1 (dla sulfanilamidu) i 2 (dla sulfametoksazolu).

W celu oceny wartości MTC dla wybranych do badań sulfonamidów przeprowadzono test MARA z wykorzystaniem procedury rozcieńczeń. Stwierdzono, że większość bioindykatorów była praktycznie niewrażliwa na badane sulfonamidy. Mikroorganizmami wrażliwymi w znacznie większym stopniu od pozostałych były szczepy *Microbacterium* spp. oraz *C. freudii*. Minimalne stężenia hamujące (MTC) wyznaczone względem tych

szczepów dla sulfanilamidu i sulfametoksazolu wynosiły odpowiednio 15 (*Microbacterium* spp.) i 19 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ (*C. freudii*).



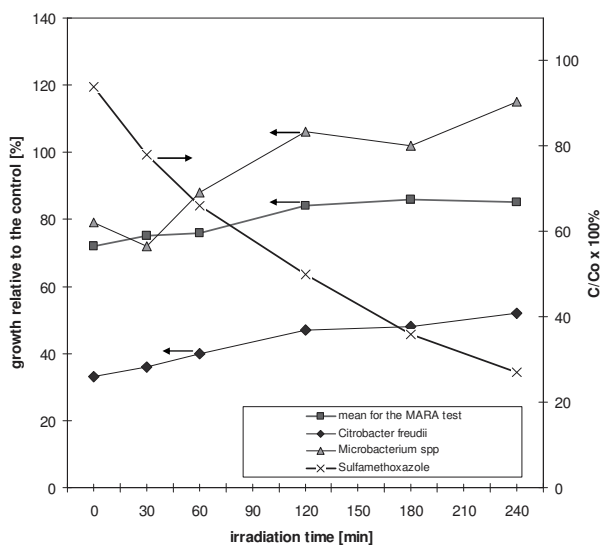
Rys. 1. Dynamika degradacji sulfanilamidu (C_0 500 $\mu\text{mol dm}^{-3}$) oraz zmian aktywności mikrobiologicznej jego roztworów po naświetlaniu promieniowaniem UV A w obecności TiO_2 (0,5 g dm^{-3})

Fig. 1. The dynamics of degradation of sulfanilamide (C_0 500 $\mu\text{mol dm}^{-3}$) and the changes in microbial activity of its solutions after UV A irradiation in the presence of TiO_2 (0.5 g dm^{-3})

Wypadkowy efekt inhibycyjny badanych próbek zmniejszał się w trakcie naświetlania (rys. 1 i 2). Szczególnie silne obniżenie inhibicji badanych próbek obserwowano względem organizmów najbardziej wrażliwych na badane sulfonamidy, a więc *Microbacterium* sp. i *C. freudii*, odpowiednio dla sulfanilamidu i sulfametoksazolu. Jest to niewątpliwie spowodowane degradacją sulfonamidów i powstawaniem praktycznie nietoksycznych względem tych mikroorganizmów produktów reakcji fotokatalitycznej. Opisany wyżej efekt jest korzystny i może świadczyć o zasadności wykorzystania procesów AOP do usuwania sulfonamidów ze ścieków, zwłaszcza że badania nad fotokatalitycznym oczyszczaniem ścieków zawierających sulfonamidy potwierdzają dużą skuteczność tych metod [7, 8].

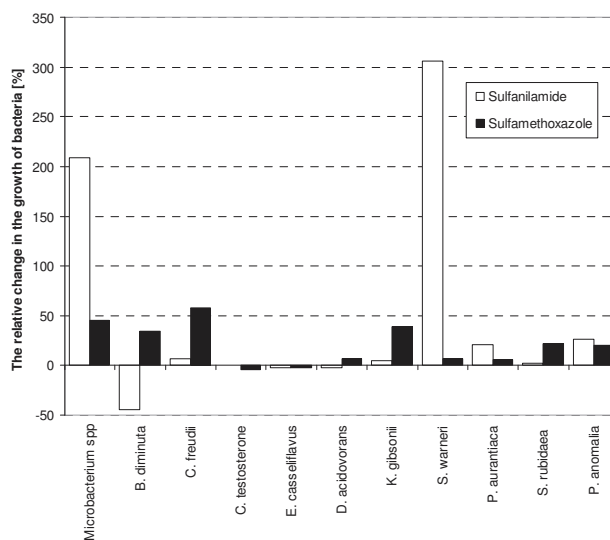
Na rysunku 3 przedstawiono względne zmiany wzrostu wszystkich mikroorganizmów testowych w roztworach badanych sulfonamidów powodowane reakcją fotokatalityczną trwającą 240 min.

W przypadku kilku szczepów mikroorganizmów o niewielkiej wrażliwości na sulfonamidy, np. *C. testosterone*, *E. casseliflavus*, *D. acidovorans*, obserwowano efekty przeciwne, tzn. toksyczność próbek względem nich rosła wraz ze wzrostem czasu naświetlania.



Rys. 2. Dynamika degradacji sulfametoksazolu (C_0 500 $\mu\text{mol dm}^{-3}$) oraz zmian aktywności mikrobiologicznej jego roztworów po naświetlaniu promieniowaniem UV A w obecności TiO_2 (0,5 g dm^{-3})

Fig. 2. The dynamics of degradation of sulfamethoxazole (C_0 500 $\mu\text{mol dm}^{-3}$) and the changes in microbial activity of its solutions after UV A irradiation in the presence of TiO_2 (0.5 g dm^{-3})



Rys. 3. Względna zmiana wzrostu mikroorganizmów testowych w roztworach zawierających sulfonamidy (C_0 500 $\mu\text{mol dm}^{-3}$) spowodowana reakcją fotokatalityczną prowadzoną przez 240 min

Fig. 3. The relative change in the growth of test microorganisms in solutions containing sulfonamides (C_0 500 $\mu\text{mol dm}^{-3}$) caused by the photocatalytic reaction carried out for 240 min

Wydaje się jednak, że fakt ten nie stanowi przekonującego dowodu na większą toksyczność produktów częściowej degradacji sulfonamidów. Uważamy, że niewielkie zmiany inhibicji są w tym przypadku wyłącznie skutkiem różnic w rozwoju szybkości namnażania mikroorganizmów testowych.

Wnioski

Proces AOP powoduje obniżenie efektu inhibicyjnego próbek zawierających sulfonamidy, jednak znacznie wolniej niż towarzysząca mu degradacja tych leków. Najsilniej efekt ten obserwowany był u mikroorganizmów bardziej wrażliwych na sulfonamidy.

Podziękowania

Praca była finansowana z umowy statutowej KNW-1-056/P/1/0.

Literatura

- [1] Baran W, Adamek E, Ziemiańska J, Sobczak A. J Hazard Mat. 2011;196:1-15. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2011.08.082.
- [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.
- [3] DANMAP, Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark, 2009, available at: http://www.danmap.org/pdfFiles/Danmap_2009.pdf.
- [4] Kemper N. Ecol Indic. 2008;8:1-13. DOI: 10.1016/j.ecolind.2007.06.002.
- [5] Onesios KM, Yu JT, Bouwer EJ. Biodegradation. 2009;20:441-466. DOI: 10.1007/s10532-008-9237-8.
- [6] Turkdogan FI, Yetilmesoy K. J Hazard Mater. 2009;166:297-308. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2008.11.012.
- [7] Klavarioti M, Mantzavinos D, Kassinos D. Environ Inter. 2009;35:402-417. DOI: 10.1016/j.envint.2008.07.009.
- [8] Ziemiańska J, Adamek E, Sobczak A, Lipska I, Makowski A, Baran W. Physicochem Probl Mineral Proc. 2010;45:127-140.
- [9] Wadhia K, Dando T, Thompson KC. J Environ Monit. 2007;9:953-958. DOI: 10.1039/B704059H.
- [10] Bi Fai P, Grant A. Ecotoxicology. 2010;19:1626-1633. DOI: 10.1007/s10646-010-0548-2.

CHANGES IN ECOTOXICITY OF SULFONAMIDES SOLUTIONS DURING THE ADVANCED OXIDATION PROCESS

¹Department of General and Inorganic Chemistry, Medical University of Silesia, Sosnowiec

²Institute of Occupational Medicine and Environmental Health, Sosnowiec

Abstract: *Advanced oxidation processes* (AOP) are often used to degrade of organic pollutants that are resistant to biodegradation and highly toxic. Examples of such substances are sulfonamides classified as synthetic chemotherapeutics agents having a bacteriostatic effect. However, the application of AOP is useful and proper only when the resulting products will be less ecotoxic than substrates. The purpose of our study was to compare the ecotoxicity of sulfanilamide and sulfamethoxazole and products of their oxidation by hydroxyl radicals (HO[•]). These radicals were generated during the photocatalytic reaction carried out in the presence of TiO₂. Ecotoxicological assessment was determined using a standardized MARA[®] toxicity test kit and procedures recommended by the test manufacturer. In MARA[®] test, eleven genetically diverse microorganisms (ten strains of bacteria and one yeast) are used as bioindicators. It was found, that the most of bioindicators was practically insensitive to sulfonamides investigated at concentrations to 500 μmol dm⁻³. *Microbacterium* spp. and *Citrobacter freundii* were much more sensitive microorganisms than the others. The *minimum inhibitory concentrations* (MTC)

determined against these strains to sulfanilamide and sulfamethoxazole were $15 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (*Microbacterium* spp.) and $19 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (*C. freundii*), respectively. Additionally, it was found that the resultant inhibitory effect on the growth of tested microorganisms decreased during the AOP, but it was much slower than accompanying degradation of sulfonamides. The strongest effect was observed with microorganisms more sensitive to sulfonamides. However, in a few cases it was observed the increase in the inhibition during the AOP.

Keywords: sulfonamides, ecotoxicity, advanced oxidation processes