

Słowa kluczowe: bioindykacja, analiza IR, farmaceutyki, reakcja Fentona

Dorota MARCIOCHA*, Joanna KALKA*, Jolanta TUREK-SZYTOW*,
Joanna SURMACZ-GÓRSKA*

ZASTOSOWANIE BIOTESTÓW W OCENIE SKUTECZNOŚCI ZAAWANSOWANEGO UTLENIANIA SULFAMETOKSAZOLU

Zmodyfikowaną reakcję Fentona zaproponowano jako metodę wstępnego podczyszczania ścieków zawierających sulfametoksazol. W celu porównania własności ekotoksykologicznych sulfametoksazolu i produktów jego rozkładu powstałych w wyniku przeprowadzenia zmodyfikowanych reakcji Fentona, wykonano testy toksyczności dla *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* i *Vibrio fischeri*. Uzyskane wyniki pozwoliły na stwierdzenie, iż zastosowane w serii drugiej badań promieniowanie UV powodowało wzrost toksyczności uzyskanych w reakcji metabolitów. Wyniki te znalazły swoje potwierdzenie w analizie różnicującej grup funkcyjnych techniką IR. Analiza widm wykazała, że w wyniku reakcji wspomaganej naświetlaniem powstawała większa ilość pasm o zróżnicowanej intensywności, co sugeruje zmianę w strukturze cząsteczki sulfametoksazolu, a tym samym powstanie większej ilości produktów odpowiedzialnych za toksyczne działanie mieszaniny.

1. WPROWADZENIE

Sulfametoksazol, jest farmaceutykiem o działaniu bakteriostatycznym, który podczas terapii farmakologicznej nie jest całkowicie metabolizowany. W rezultacie przedostaje się on w niezmięnionej, czynnej biologicznie formie do ścieków. Stwierdzono, iż sulfametoksazol jest związkiem trwałym, usuwanym w konwencjonalnej oczyszczalni ścieków w stopniu nie większym niż 50% [7,8,9]. Mikroorganizmy w wyniku obcowania z lekiem w środowisku wodnym i wodno-ściekowym nabywają oporności na jego działanie. Powoduje to istotne konsekwencje gospodarcze i zdrowotne, dlatego też ważne jest opracowanie takiej metody podczyszczania ścieków, dzięki której możliwe byłoby zwiększenie biodostępności preparatu i jego pochodnych, a tym samym podniesienie efektywności usuwania sulfametoksazolu ze ścieków [3,4].

* Politechnika Śląska, Katedra Biotechnologii Środowiskowej, ul. Akademicka 2A,
44-100 Gliwice, e-mail: dmarciocha@wp.pl

2. MATERIAŁY I METODY

2.1. BADANA SUBSTANCJA I MIESZANINY POREAKCYJNE

Sulfametoxazol został zakupiony w najwyższej możliwej czystości u dystrybutora preparatów chemicznych (Sigma-Aldrich).

Mieszanki poreakcyjne otrzymano na drodze zmodyfikowanej reakcji Fentona [10]. Reakcji poddawano wodny roztwór sulfametoksazolu o stężeniu 60 mg/l. W serii (1) - nadtlenek wodoru został zastąpiony sprężonym powietrzem oraz wprowadzono jony miedzi (II) jako drugi katalizator; w serii (2)-dodatkowo zastosowano naświetlanie promieniowaniem UV. Na podstawie badań wstępnych, optymalny czas reakcji został ustalony na 1,5 h przy wartości pH= 5. Ze względu na kwaśny odczyn roztworów pobiodegradacyjnych po zakończeniu reakcji roztwory pobiodegradacyjne serii (1) i (2) alkalizowano do wartości pH 7.

2.2. ANALIZY FIZYKO-CHEMICZNE

Stężenie leku mierzono za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej, HPLC - UVD 340u firmy Gynkotek o objętości nastrzyku równym 20 μ l. Do oznaczeń użyto jako eluentu acetonitrylu z buforem fosforanowym o pH = 3 w stosunku 30:70 o przepływie 1ml/min na kolumnie RP – 18. Detekcja sulfametoksazolu następowała po 6,5 minutach, przy długości fali równej $\lambda = 269$ nm.

Oznaczenia rozpuszczonego węgla organicznego (RWO) wykonywano na aparacie do analizy całkowitego węgla organicznego TOC - V_{CSH} firmy Shimadzu.

Biochemiczne zapotrzebowanie tlenu oznaczano za pomocą urządzenia WTW OxiTop.

Widma w podczerwieni zostały wykonane dla wodnych roztworów sulfametoksazolu i mieszanin poreakcyjnych. W tym celu roztwory poddano ekstrakcji w chloroformie, cykloheksanie oraz 2,2,4 – trimetylopentanie. Zastosowano jednokrotną ekstrakcję w stosunku objętościowym 50ml/50ml przez 1h, następnie zatężono otrzymane roztwory na wyparce próżniowej do 1/3 objętości. Analizy wykonywano za pomocą aparatu do adsorpcji w podczerwieni IR firmy BIO-RAD typ FTS 135 z transformacją Fouriera. Widma były rejestrowane jako pasma transmitancji. Identyfikację poszczególnych grup funkcyjnych czy charakterystycznych wiązań dokonano w oparciu o tzw. tablice korelacyjne [12].

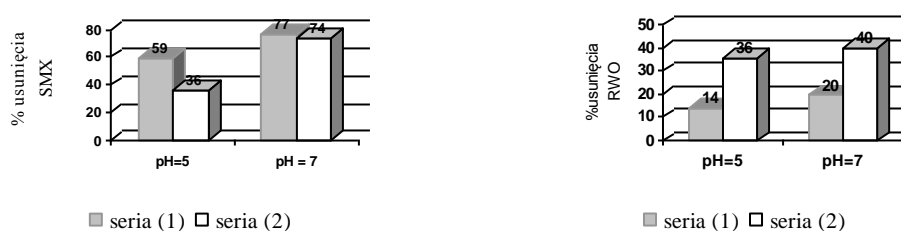
2.3. TESTY TOKSYCZNOŚCI

Testy toksyczności dla *Daphnia magna* i *Pseudokirchneriella subcapitata* prowadzono zgodnie z wytycznymi OECD do badań substancji chemicznych [11]. Każdy test składał się z próby kontrolnej oraz szeregu pięciu stężeń badanej substancji lub roztworu poreakcyjnego. Wartość EC₅₀ obliczano metodą logarytmiczno-probitową; IC₅₀ wyznaczono metodą interpolacji graficznej.

Test toksyczności dla *Vibrio fischeri* wykonano z zastosowaniem systemu Microtox. Toksyczność roztworu sulfametoksazolu oceniano zgodnie z procedurą Basic Test, opisaną przez producenta; roztwory pobiodegradacyjne uzyskane w serii (1) i (2) badano zgodnie z procedurą EPA WET (whole effluent toxicity) [1].

3. WYNIKI BADAŃ I WNIOSKI

Rysunek 1 przedstawia efekt usunięcia sulfametoksazolu i rozpuszczonego węgla organicznego w serii (1) i (2).



Rys.1. Usunięcie sulfametoksazolu i węgla organicznego w serii (1) i (2); SMX – sulfametoksazol, RWO – rozpuszczony węgiel organiczny

Większe usunięcie sulfametoksazolu po 1,5 h eksperymentu uzyskano w serii (1) i wynosiło ono 59%. W przypadku reakcji wspomaganej promieniowaniem (seria (2)) usunięcie wynosiło 36%. Niższy stopień usunięcia farmaceutyku w próbach naświetlanych promieniami UV spowodowany był rozpadem kompleksu leku z jonem żelaza(III). Prawdopodobnie następowała wówczas redukcja żelaza Fe^{3+} do żelaza Fe^{2+} i jednocześnie rozpad kompleksu Fe^{3+} - sulfametoksazol. Mechanizm ten był wzmocniony przez obecność jonów miedzi Cu^{+2} , która jako pierwiastek bloku przejściowego ma zdolność tworzenia kompleksów oraz możliwość występowania na dwóch stopniach utlenienia, co powoduje, że może ulegać podobnym przemianom jak jon żelaza. W efekcie końcowej alkalizacji roztworów pobiodegradacyjnych nastąpił wzrost stopnia usunięcia sulfametoksazolu spowodowany procesem koagulacji strącającego się wodorotlenku żelaza (III) w postaci $Fe(OH)_3$. Usunięcie leku było nieznacznie większe dla serii (1) po korekcie odczynu z pH = 5 do pH = 7. Pod wpływem promieni UV następowała redukcja Fe^{+3} do Fe^{+2} , co było przyczyną zmniejszenia ilości $Fe(OH)_3$ w roztworze i powrotu części skoagulowanego wcześniej farmaceutyku do roztworu.

Odmianą prawidłowość obserwowano w przypadku usunięcia węgla organicznego. Wolne rodniki hydroksylowe powstałe dzięki regeneracji Fe^{+3} do Fe^{+2} pod wpływem promieniowania UV przyczyniły się do zwiększenia stopnia mineralizacji roztworu. Obserwowano 14% usunięcie węgla organicznego w serii (1) i 20% usunięcie w serii (2) (rys. 1). Roztwór pobiodegradacyjny uzyskany w serii (2) był również bardziej biodostępny. Stosunek BZT₅:RWO, był dla roztworu serii (2) najwyższy (tab. 1). Można zatem przypuszczać, iż stosowanie zmodyfikowanej reakcji

Fentona wspólnie z naświetlaniem promieniami UV jako metody wstępnego podczyszczania ścieków, powinno zwiększyć efekt usunięcia sulfametoksazolu podczas biologicznego oczyszczania. Jak wynika z badań Gonzaleza i współautorów, w konwencjonalnej reakcji foto-Fentona (dla roztworu poreakcyjnego sulfametoksazolu o stężeniu 200 mg/l; przy silnym zakwaszeniu próby do pH=2,8 i stężeniu H₂O₂ ≥500 mg/l) maksymalna wartość współczynnika podatności na biodegradację wynosiła 0,39 [4].

Tab. 1. Stosunek BZT₅ do RWO

	Roztwór sulfametaksazolu	Seria (1)	Seria (2)
BZT ₅ /RWO	0,05	0,31	0,43

Wyniki testów toksyczności dla sulfametoksazolu i roztworów poreakcyjnych uzyskanych w serii (1) i (2) przedstawiono w tabelach 2 i 3. Najsilniejsze toksyczne działanie sulfametoksazolu obserwowano w stosunku do glonów. Dla tych organizmów badana substancja została zaklasyfikowana jako toksyczna. Również w badaniach Isidori i wsp. oraz Halling-Sorensen glony okazały się najbardziej wrażliwe na sulfametoksazol [5,6]. Toksyczność sulfametoksazolu dla bakterii *Vibrio fischeri* była na znacznie niższym poziomie; EC₅₀ wynosiło 46.8 mg/l. Wyniki prezentowane w pracy znajdują potwierdzenie we wcześniejszych doniesieniach, gdzie toksyczność 20 antybiotyków była badana za pomocą testu Microtox. Pyrimethamina i sulfisomidyna, inhibitory syntezy kwasu foliowego, do których należy również sulfametoksazol wykazywały w tych badaniach nieznaczną toksyczność w stosunku do *Vibrio fischeri* [2].

Nie obserwowano wpływu sulfametoksazolu na *Daphnia magna* w teście toksyczności ostrej. Wysokie wartości wskaźników toksyczności sulfametoksazolu pozwalają na stwierdzenie, iż ten farmaceutyk nie powinien powodować efektów ostrych w środowisku wodnym, gdyż rzeczywiste stężenia sulfametoksazolu w wodach powierzchniowych mogą wynosić przeciętnie 0,02-0,126 µg/l [6,7].

Tab. 2. Toksyczność sulfametoksazolu dla dafni, glonów i bakterii

Badana substancja	<i>Daphnia magna</i> EC ₅₀ [mg/dm ³]	<i>Pseudokirchneriella</i> <i>subcapitata</i> IC ₅₀ [mg/dm ³]	<i>Vibrio fischeri</i> EC ₅₀ [mg/dm ³]
Sulfametoksazol	>100	5.4	46.8

Toksyczność roztworów pobiodegradacyjnych serii (1) i (2) znacznie obniżyła się w stosunku do toksyczności roztworu samego sulfametoksazolu w testach na glonach i bakteriach (tab. 3). Toksyczność tych roztworów nieznacznie wzrosła w stosunku do dafni, nadal jednak utrzymywała się na niskim poziomie. Porównując wpływ zastosowanej metody chemicznego utleniania farmaceutyku na jego toksyczność można stwierdzić, iż niezależnie od tego jak toksyczny był roztwór wyjściowy

sulfametoksazolu, jego pochodne uzyskane po serii (2) były bardziej toksyczne niż pochodne uzyskane w serii (1).

Tab. 3. Jednostki toksyczności badanych roztworów

	<i>Daphnia magna</i> TU	<i>Pseudokirchneriella</i> <i>subcapitata</i> TU	<i>Vibrio fisheri</i> TU
Sulfametoksazol	<1	>100	21.4
Seria (1)	9.3	3.2	5.9
Seria (2)	10.5	3.8	8.9

Analizując widma IR wodnego roztworu sulfametoksazolu i mieszanin poreakcyjnych w 3 rozpuszczalnikach organicznych. W tabeli 4 przedstawiono charakterystyczne wartości transmitancji grup funkcyjnych oraz ich występowanie w ekstraktach sulfametoksazolu oraz mieszanin poreakcyjnych serii (1) i (2). Na ich podstawie można wysnuć hipotezę, iż pod wpływem utleniania chemicznego i naświetlania promieniami UV nastąpiła zmiana struktury sulfametoksazolu. Zarówno w serii (1) jak i (2) najprawdopodobniej doszło do rozerwania pierścienia eteru cyklicznego oraz zostało zerwane wiązanie sulfonoamidowe. Zmienił się również sposób podstawienia cząsteczki benzenu. Pierwotne podstawienie 1,4-di- w cząsteczce sulfametoksazolu zostało zachowane w roztworze serii (1), natomiast w serii (2) mogło ulec przekształceniu w 1,3-di-.

Tab. 4. Zestawienie grup funkcyjnych i odpowiadających im transmitacji obecnych w ekstraktach 3 rozpuszczalników organicznych

Rodzaj drgań	Związek lub grupa	Zakres [cm ⁻¹]	Uwagi
CYKLOHEKSAN			
C-O-C	Etery niecykliczne	1170 – 1060	pik występuje tylko w widmie serii (2)
R-SO ₂ -OH	Kwasy sulfonowe	1080 - 1010	pik występuje w widmie serii (1) i (2)
-CH ₂ -OH	Alkohole i fenole	1080 – 1000	pik występuje w widmie serii (1) i (2)
=CH-OH		1130 - 1000	
CHLOROFORM			
C-N	Aminy	1090 ÷ 1068	pik występuje w widmie serii (1) i (2)
C-O-C	Etery aromatyczne	1075-1020	pik występuje tylko w widmie sulfametoksazolu
-CH ₂ -OH	Alkohole i fenole	1080 – 1000	pik występuje w widmie serii (1) i (2)
=CH-OH		1130 - 1000	
R-SO ₂ -OH	Kwasy sulfonowe	1080 - 1010	pik występuje w widmie serii (1) i (2)
2,2,4-TRIMETYLOPENTAN			
C-H	W pierścieniu	1085 – 1065	pik występuje w widmie serii (1) i (2)
		1030 - 1010	
R-SO ₂ -OH	Kwasy sulfonowe	1080 - 1010	pik występuje w widmie serii (1) i (2)
-CH ₂ -OH	Alkohole i fenole	1080 – 1000	pik występuje w widmie serii (1) i (2)
=CH-OH		1130 - 1000	
1,3-di-	sposób podstawienia w benzenie	900-835 810-750 725-670	piki występują w widmie serii (2)
1,4-di-	sposób podstawienia w benzenie	860-800	piki występują w widmie serii (1) –jest to pierwotne podstawienie cząsteczki sulfametoksazolu

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, iż w wyniku zmodyfikowanej reakcji Fentona powstawały nowe substancje różniące się budową od macierzystego związku, co mogło mieć wpływ na zmianę toksyczności badanego farmaceutyku. Przemiany cząsteczki farmaceutyku pod wpływem promieniowania UV prowadziły do powstania większej ilości produktów rozkładu w serii (2). Przeprowadzenie zmodyfikowanej reakcji Fentona wpłynęło na poprawę podatności sulfametoksazolu na biodegradację, dzięki czemu związek ten powinien być łatwiej usuwany w biologicznej oczyszczalni ścieków.

LITERATURA

- [1] Azur Environmenal. 1999. *Microtox Standard Operational Procedure*.
- [2] Backhaus T., Grimme L.H. 1999. *The toxicity of antibiotic agents to the luminescent bacterium Vibrio fischeri*. Chemosphere, 38:3291-3301.
- [3] Drillia P., Dokianakis S.N., Fountoulakis M.S., Kornaros M, Stamatelatu K, Lyberatos G. 2005. *On the occasional biodegradation of pharmaceuticals in the activated sludge process: The example of the antibiotic sulfamethoxazole*. J. Haz. Mat., 122: 259–265.
- [4] Gonzalez O., Sans C., Esplugas S. 2007. *Sulfamethoxazole abatement by photo-Fenton toxicity, inhibition and biodegradability assessment of intermediates*. J. Haz. Mat., 146: 459-464.
- [5] Halling-Sorensen B, Nor Nielsen S, Lanzky PF, Ingerslev F, Holten Latzhof HC, Jbrgensen SE. 1998. *Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment—a review*. Chemosphere, 36:357– 93.
- [6] Isidori M., Lavorgna M., Nardelli A., Pascarella L., Parella A. 2005. *Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms*. Science of the Total Environment, 346: 87-98.
- [7] Knacker T., Liebig M., Moltmann J. 2006. *Environmental Risk Assessment*. W: Human Pharmaceuticals Hormones and Fragrances, T. Ternes and A. Joss (red.) IWA Publishing, London-New York, 121-148.
- [8] Kümmerer K., Alexy R., Huttig J., Scholl A. 2004. *Standardized tests fail to assess the effects of antibiotics on environmental bacteria*, Water Res. 38: 2111–2116.
- [9] Lam M.W., Young C.J., Brain R.A., Johnson D.J., Hanson M.A., Wilson C.J., Richards S.M., Solomon K.R., Mabury S.A. 2004. *Aquatic persistence of eight pharmaceuticals in a microcosm study*. Environ. Toxicol. Chem. 23: 1431–1444
- [10] Marciocha D., Felis E., Surmacz – Górska J. 2007. *Parameters of pretreating wastewater polluted with chemicals based on modified Fenton's reaction*. EPE, 33: 165-173.
- [11] OECD *Guidelines for the testing of chemicals*, Paris, 1993.
- [12] Zieliński W., Rajca A. (red.) 2000. *Metody spektroskopowe i ich zastosowanie do identyfikacji związków organicznych*, WNT Warszawa.

Autorzy pragną wyrazić wdzięczność Ministerstwu Nauki i Szkolnictwa Wyższego za finansowe wsparcie badań w ramach grantu 1T09D 085 30.

BIOTESTS APPLICATION FOR THE MEASUREMENT OF SULFAMETHOXAZOLE ADVANCED OXIDATION (ABSTRACT)

Toxicity tests were conducted for the measurement of the efficiency treatment of sulfamethoxazole solution. As co-trimoxazoles are not inherently biodegradable, modified Fentons' reaction was proposed as a pre-treatment step. Modification of Fentons' reaction was based on application of: UV radiation, compressed air and Cu²⁺, as a reaction promoter. Efficiency of chemical pre-treatment differed within the range 30-50 %. Toxicity of sulfamethoxazole metabolites was higher, when UV radiation was applied, but biodegradation potential increased 9-fold.