

Wojciech BARAN¹, Ewa ADAMEK¹, Izabela SZOŁTYSEK-BOŁDYS¹
i Andrzej SOBCZAK²

BADANIA WSTĘPNE NAD DEGRADACJĄ I MINERALIZACJĄ WYBRANYCH ANTYBIOTYKÓW METODĄ FENTONA

PRELIMINARY STUDIES ON DEGRADATION AND MINERALIZATION OF THE SELECTED ANTIBIOTICS BY FENTON METHOD

Abstrakt: Celem pracy było wyznaczenie efektywności metody Fentona (inicjowanej małymi dawkami FeSO₄ i H₂O₂) w procesach degradacji oraz mineralizacji dużych dawek ampicyliny, doksycykliny, tylozyny i sulfotiazolu w środowisku wodnym oraz w ściekach przygotowanych zgodnie z normą ISO 9887:1992. W trakcie badań określono również zależność pomiędzy efektywnością degradacji sulfotiazolu a stężeniami substratów reakcji Fentona. Stwierdzono, że badany proces degradacji jest pierwszorzędowy względem degradowanego substratu. Możliwe było osiągnięcie praktycznie 100% degradacji badanych leków przy niskich stężeniach FeSO₄ i H₂O₂. W roztworach wodnych zawierających 0,2 mmol/dm³ antybiotyku wynosiły one odpowiednio < 0,2 i < 2 mmol/dm³, a dla ścieków < 1,5 i < 20 mmol/dm³ FeSO₄ i H₂O₂. Jednak w zastosowanych warunkach praktycznie nie obserwowano mineralizacji roztworów badanych antybiotyków pomimo znacznego wydłużania czasu reakcji. Oznacza to, że roztwory te zawierają trwałe, organiczne produkty transformacji tych leków o nieustalanej aktywności przeciwbakteryjnej.

Słowa kluczowe: antybiotyki, środowisko, ekotoksyczność, testy toksyczności

Wstęp

We współczesnym świecie powszechne staje się wykorzystanie antybiotyków do poprawy efektywności hodowli zwierząt. Według Amerykańskiej Agencji ds. Żywności i Leków (FDA), tylko w 2009 roku w USA zużyto 16 400 ton antybiotyków, z czego prawie 80% zostało użyte w produkcji żywności. Leki te były stosowane w większości w lecznictwie i profilaktyce chorób zwierząt, a około 1300 ton zostało zastosowane jako stymulujące wzrost dodatki do pasz [1, 2]. W konsekwencji rolnictwo staje się głównym źródłem zanieczyszczenia środowiska antybiotykami. Poza samymi lekami i produktami ich metabolizmu, ścieki pochodzące są najprawdopodobniej największym źródłem lekoopornych mikroorganizmów [3]. Dlatego intensywnie poszukuje się tanich i skutecznych metod usuwania tych leków ze ścieków. Szczególnie wysoką skutecznością w usuwaniu zarówno antybiotyków, jak i dezynfekcji ścieków charakteryzują się metody pogłębionego utleniania (Advanced Oxidation Processes, AOP). Jedną z takich metod jest znany od niemal 150 lat proces Fentona, czyli reakcja inicjowana związkami żelaza i nadtlakiem wodoru [4, 5]:



¹ Zakład Chemii Ogólnej i Nieorganicznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec, tel. 32 364 15 64, email: bw-xxl@wp.pl

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

* Praca była prezentowana podczas konferencji ECOpole'14, Jarnołtówek, 15-17.10.2014

Powstające w wyniku tej reakcji rodniki hydroksylowe są wysoce aktywnym, ale nieselektywnym czynnikiem utleniającym. Przy pełnej mineralizacji rozkładają one związki organiczne do dwutlenku węgla, wody i jonów nieorganicznych.

Niewątpliwe zalety procesu Fentona to prostota, duża szybkość i wysoka efektywność. Jednak proces ten posiada również istotne ograniczenia. Pierwsze to fakt, iż wymaga kwaśnego środowiska reakcji. Drugim, związanym z nieselektywnością procesu, jest duża konsumpcja substratów [5]. Według Elmolla i Chaudhuri [6], obniżenie ChZT 1 m³ ścieków z wartości 1000 mg O₂/dm³ o połowę wymaga użycia niemal 10 kg perhydrolu (30% H₂O₂). Z kolei Ben i in. [7] uzyskali niemal 100% efektywność usuwania leków przeciwbakteryjnych ze ścieków, jednak na 1 mg O₂ (w teście ChZT) użyli 2,12 mg H₂O₂ i 6,99 mg jonów Fe²⁺. Tymczasem ChZT ścieków z tuczu trzody chlewnej może wynosić nawet ponad 60 000 mg O₂/dm³ [8].

Celem pracy było wyznaczenie efektywności metody Fentona (inicjowanej małymi dawkami FeSO₄ i H₂O₂) w procesach degradacji oraz mineralizacji dużych dawek ampicyliny, doksyliny, tylozyny i sulfatiazolu w środowisku wodnym oraz w ściekach przygotowanych zgodnie z normą ISO 9887;1992.

Materiały i metody

Wybrane do badań antybiotyki oraz metodyka ich oznaczania zostały scharakteryzowane w tabeli 1.

Tabela 1

Charakterystyka badanych antybiotyków

Table 1

Characteristics of the investigated antibiotics

Nazwa (numer CAS)	Producent (czystość)	Warunki analizy HPLC (chromatograf YL9100 Young Lin; Korea Pd.)		
		eluent	kolumna	dł. fali detektora [nm]
Ampicylina - sól sodowa (69-53-4)	Sigma-Aldrich (91,0 - 100,5)	AcCN - 5%; 0,1% roztwór HCOOH - 95%	Supelcosil LC-18; 5 µm; 250×4,6 mm	210
Tylozyny winian (1401-69-0)	Sigma-Aldrich (moc leku ≥ 800 jednostki/mg)	AcCN - 70%; roztwór H ₃ PO ₄ o pH 2,7 - 30%	Hypersil C-18; 5 µm; 150×2,1 mm	290
Doksyliny hyklat (24390-14-5)	Sigma-Aldrich (≥ 98%)	AcCN - 70%; roztwór H ₃ PO ₄ o pH 2,7 - 30%	Hypersil C-18; ziarno 5 µm; 150×2,1 mm	360
Sulfatiazol - sól sodowa (144-74-1)	Sigma-Aldrich (> 99%)	AcCN - 5%; 0,1% roztwór HCOOH - 95%	Supelcosil LC-18; 5 µm; 250×4,6 mm	272

Wszystkie pozostałe odczynniki używane w eksperymencie były w klasie czystości do analizy.

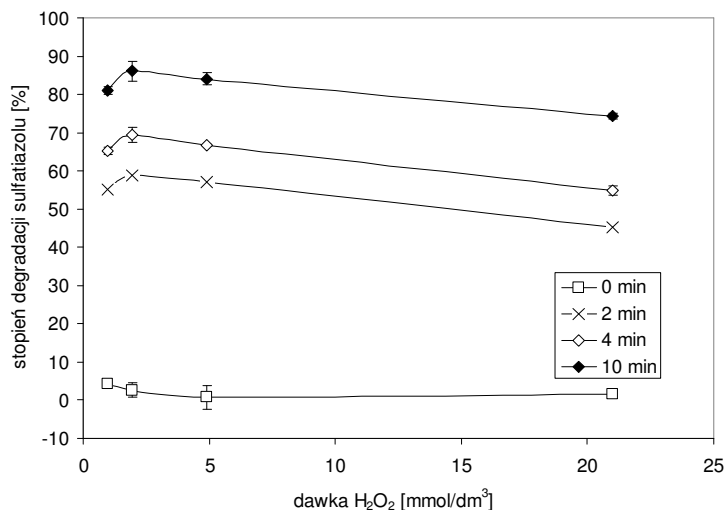
Naważki badanych leków rozpuszczano w wodzie destylowanej lub w ściekach syntetycznych przygotowanych zgodnie z normą ISO 9887;1992. Następnie do intensywnie mieszanych roztworów tych leków dodawano odmierzonej ilości świeżo przygotowanego roztworu FeSO₄ (20 g/dm³ 0,4% H₂SO₄) i roztworu H₂SO₄. We wszystkich

eksperymentach korygowano pH środowiska reakcji do wartości $\sim 3,5$. Na podstawie danych literaturowych przyjęto, że jest to najwyższa wartość pH, gwarantująca stabilny i wysoce efektywny przebieg reakcji Fentona [5-7].

Po 5 minutach mieszania do badanych roztworów dodawano określonej w eksperymencie objętości roztworu H_2O_2 (30%). Próbkę do analizy o objętości 2 cm^3 pobierano przed i po dodaniu H_2O_2 , po założonym w eksperymencie czasie, przenosząc je do przygotowanych wcześniej probówek zawierających po $0,1\text{ cm}^3$ roztworu NaOH. Następnie próbki intensywnie mieszano i odwirowywano (5 min, 4000 rpm). W trakcie wszystkich czynności badane roztwory były chronione przed światłem. Przed analizą próbki przechowywano w obniżonej temperaturze w całkowitej ciemności. Oznaczano w nich, każdorazowo w odniesieniu do roztworów wyjściowych, stężenie badanych antybiotyków (metodą opisaną w tabeli 1) oraz, w wybranych eksperymentach, stężenie ogólnego węgla organicznego (OWO). OWO wyznaczano metodą Langego, wykorzystując testy kuwetowe LCK385 ($3\text{-}30\text{ mg/dm}^3\text{ C}$) i spektrofotometr VIS DR 3900; HACH-LANGE. Usunięcie OWO roztworów jest miarą ich mineralizacji. W wyjściowych ściekach oznaczano również wartości ChZT, wykorzystując testy kuwetowe LCK514 ($100\text{-}2000\text{ mg O}_2/\text{dm}^3$).

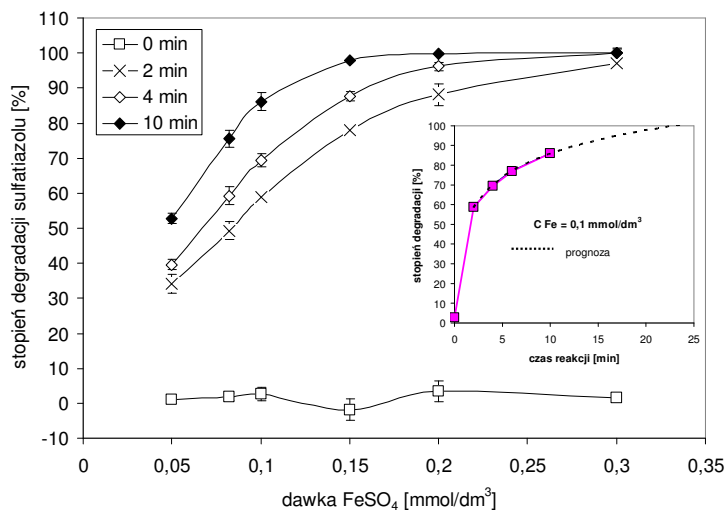
Rezultaty i dyskusja

Pierwszy etap badań obejmował ustalenie minimalnych dawek reagentów procesu Fentona (H_2O_2 i $FeSO_4$) koniecznych do całkowitej degradacji obecnego w roztworze substratu. Etap ten realizowano, badając kinetykę degradacji wodnego roztworu sulfatiazolu ($0,1\text{ mmol/dm}^3$). Uzyskane rezultaty przedstawiono na rysunkach 1 i 2.



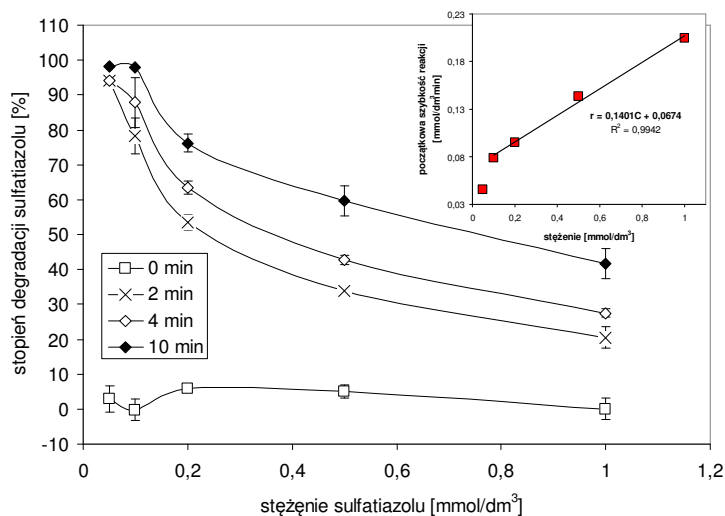
Rys. 1. Wpływ dawki H_2O_2 na dynamikę degradacji sulfatiazolu ($0,1\text{ mmol/dm}^3$) podczas reakcji Fentona prowadzonej w obecności $FeSO_4$ ($0,1\text{ mmol/dm}^3$) przy pH 3,46-3,49

Fig. 1. The effect of H_2O_2 dose on the dynamics of sulfathiazole ($0,1\text{ mmol/dm}^3$) degradation during the Fenton's reaction carried out in the presence of $FeSO_4$ ($0,1\text{ mmol/dm}^3$) at pH 3.46-3.49



Rys. 2. Wpływ dawki FeSO_4 na dynamikę degradacji sulfatiazolu ($0,1 \text{ mmol/dm}^3$) podczas reakcji Fentona prowadzonej w obecności H_2O_2 ($1,96 \text{ mmol/dm}^3$) przy pH 3,46-3,55

Fig. 2. The effect of FeSO_4 dose on the dynamics of sulfathiazole (0.1 mmol/dm^3) degradation during the Fenton's reaction carried out in the presence of H_2O_2 (1.96 mmol/dm^3) at pH 3.46-3.55

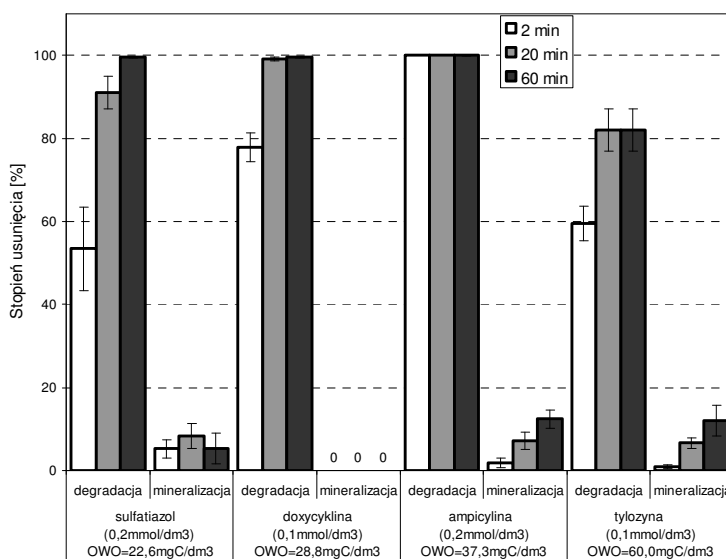


Rys. 3. Wpływ stężenia początkowego sulfatiazolu na dynamikę i kinetykę jego degradacji podczas reakcji Fentona prowadzonej w obecności H_2O_2 ($1,96 \text{ mmol/dm}^3$) i FeSO_4 ($0,15 \text{ mmol/dm}^3$) przy pH 3,49-3,51

Fig. 3. The effect of the initial sulfathiazole concentration on the dynamics and the degradation kinetics of the sulfonamide. The Fenton's process was carried out in the presence of H_2O_2 (1.96 mmol/dm^3) and FeSO_4 (0.15 mmol/dm^3) at pH 3.49-3.51

Zastosowane w trakcie eksperymentów warunki pozwoliły na niemal całkowity rozkład sulfatiazolu. Stwierdzono, że w stosunku do zastosowanych stężeń FeSO_4 istnieje optymalna dawka H_2O_2 . W badanym przypadku wynosiła ona $\sim 2 \text{ mmol/dm}^3$. Jednak zmiana tej dawki nie powodowała istotnych zmian w kinetyce reakcji Fentona (rys. 1). Podobne konkluzje zostały podane również przez innych badaczy [5, 6]. Dla odmiany wielkość dawki FeSO_4 okazała się bardzo istotna (rys. 2). Im wyższe stężenie soli Fe, tym szybciej osiągnano całkowitą degradację sulfatiazolu. W zastosowanych warunkach wielkością graniczną była dawka FeSO_4 wynosząca $0,15 \text{ mmol/dm}^3$. Prawdopodobnie jej obniżenie poniżej tej wartości również umożliwiłoby całkowity rozkład substratu, niemniej czas reakcji ulegałby nieproporcjonalnemu wydłużeniu (rys. 2, prognoza). Jest to spowodowane efektem nieodwracalnego zużycia reagentów [5].

Na rysunku 3 przedstawiono wpływ stężenia początkowego substratu (sulfatiazolu) na dynamikę jego degradacji w warunkach uznanych wcześniej za optymalne. Zgodnie z oczekiwaniami stwierdzono, że wzrost stężenia sulfatiazolu powoduje obniżenie uzyskanego stopnia jego degradacji. Zjawiska tego nie kompensuje liniowa zależność pomiędzy stężeniem substratu a początkową szybkością reakcji Fentona (rys. 3, górny róg), ponieważ szybkość ta po wyczerpaniu reagentów ulega radykalnemu obniżeniu (rys. 2).

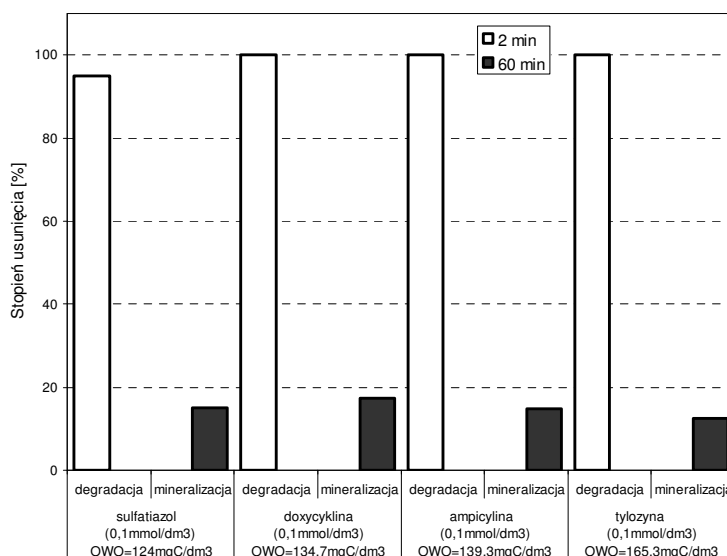


Rys. 4. Przebieg degradacji i mineralizacji roztworów badanych antybiotyków w wodzie destylowanej podczas reakcji Fentona prowadzonej w obecności FeSO_4 ($0,15 \text{ mmol/dm}^3$) i H_2O_2 ($1,96 \text{ mmol/dm}^3$). pH roztworów wynosiło 3,20-3,50

Fig. 4. The course of degradation and mineralization of the studied antibiotics solutions (in distilled water) during Fenton's process carried out in the presence of FeSO_4 ($0,15 \text{ mmol/dm}^3$) and H_2O_2 ($1,96 \text{ mmol/dm}^3$). The final pH of solutions was 3,20-3,50

Drugi etap badań obejmował ocenę efektywności degradacji i mineralizacji 4 wybranych leków (tab. 1) za pomocą procesu Fentona inicjowanego poprzez

zastosowanie granicznie niskich dawek H_2O_2 i $FeSO_4$. Aby wyjściowe wartości OWO badanych roztworów były zbliżone (z wyjątkiem roztworu tylozyny), stężenia sulfatiazolu i ampicyliny były dwukrotnie większe niż doxycykliny. Rezultaty uzyskane w roztworach wodnych przedstawiono na rysunku 4. Na rysunku tym zamieszczono również informacje o wartościach OWO wyznaczonych dla wyjściowych roztworów badanych antybiotyków.



Rys. 5. Przebieg degradacji i mineralizacji roztworów badanych antybiotyków w ściekach syntetycznych podczas reakcji Fentona prowadzonej w obecności $FeSO_4$ ($1,0 \text{ mmol/dm}^3$) i H_2O_2 ($19,6 \text{ mmol/dm}^3$). pH roztworów wynosiło 3,51-3,55

Fig. 5. The course of degradation and mineralization of the studied antibiotics solutions (in synthetic wastewater) during Fenton's process carried out in the presence of $FeSO_4$ (1.0 mmol/dm^3) and H_2O_2 (19.6 mmol/dm^3). The final pH of solutions was 3.51-3.55

Wszystkie badane leki podczas procesu Fentona ulegały degradacji. Najbardziej podatna okazała się ampicylina. Jednak w przypadku tego antybiotyku po dodaniu $FeSO_4$, ale jeszcze przed dodaniem H_2O_2 obserwowano obniżenie jego stężenia o niemal 70%. Oznacza to, że antybiotyk ten został związany przez sól żelaza i nie stanowi to dowodu jego degradacji. W zastosowanych warunkach najwolniej usuwane z roztworów były tylozyna i sulfatiazol. W przypadku tylozyny mogło to być spowodowane wysoką wartością OWO jej roztworu. Natomiast mniejsza dynamika degradacji sulfatiazolu może być dowodem większej odporności chemicznej tej substancji w porównaniu do pozostałych badanych antybiotyków. Niestety, degradacji wszystkich badanych leków towarzyszyło jedynie niewielkie (lub żadne, w przypadku doxycykliny) obniżenie wartości OWO (rys. 4, mineralizacja). Świadczy to, że proces Fentona spowodował jedynie transformację tych badanych leków. Produktami tego procesu mogą być inne, potencjalnie również wysoce aktywne biologicznie substancje. Przykładowo, w wyniku reakcji sulfonamidów z rodnikami HO^\bullet powstaje m.in. równie aktywny i bardziej toksyczny sulfanilamid [9, 10].

Wyniki uzyskane po reakcji Fentona prowadzonej w ściekach syntetycznych aplikowanych badanymi lekami przedstawiono na rysunku 5. W związku z wyższymi wartościami OWO ścieków niż wody destylowanej w eksperymencie zastosowano wyższe dawki reagentów.

Już po 2 minutach reakcji uzyskano praktycznie 100% usunięcie badanych antybiotyków (w przypadku sulfatiazolu 95%). Ponieważ ChZT badanych ścieków wynosiło średnio około 400 mg O₂/dm³, po przeliczeniu zastosowanych dawek oznacza to, że na 1 mg O₂ zużyto ~0,14 mg Fe²⁺ i ~0,17 mg H₂O₂, a więc wielokrotnie mniej, niż sugerują np. Ben i in. [7]. Jednak w tym samym czasie stopień usunięcia OWO ścieków wyniósł < 5%, a po 60 min reakcji osiągnęło jedynie od 12,5 (z tylozyną) do 17,4% (z doksycykliną). Oznacza to, że ścieki po procesie Fentona prowadzonym w takich warunkach nadal zawierają dużo związków organicznych. Zatem ocena rzeczywistej efektywności badanego procesu wymaga określenia aktywności biologicznej pozostałych po tym procesie produktów.

Wnioski

Zastosowanie procesu Fentona do oczyszczania ścieków zawierających wysokie stężenia antybiotyków gwarantuje ich całkowite usunięcie. Możliwe było osiągnięcie praktycznie 100% degradacji badanych leków przy niskich stężeniach FeSO₄ i H₂O₂ wynoszących odpowiednio 0,14 mg Fe²⁺ i ~0,17 mg H₂O₂ na 1 mg O₂/dm³ ścieków. Jednak w opisanych warunkach praktycznie nie obserwowano mineralizacji roztworów badanych antybiotyków pomimo znacznego wydłużania czasu reakcji. Oznacza to, że roztwory te zawierają trwałe, organiczne produkty transformacji tych leków o nieustalonej aktywności przeciwbakteryjnej.

Podziękowania

Badania były finansowane z grantu NCN nr UMO-2011/03/D/NZ7/01684.

Literatura

- [1] Hollis A, Ahmed Z. *N Engl J Med.* 2013;369:2474-2476. DOI: 10.1056/NEJMp1311479.
- [2] Summary Report on Antimicrobials Sold or Distributed for Use in Food-producing Animals, Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services 2009. 2010:1. <http://www.fda.gov/downloads/ForIndustry/UserFees/AnimalDrugUserFeeActADUFA/UCM231851.pdf>.
- [3] DANMAP 2012 - 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%202012/Danmap_2012.ashx.
- [4] Fenton HJH. *Chem News.* 1876;33:190-190.
- [5] Babuponnusami A, Muthukumar K. *J Environ Chem Eng.* 2014;2:557-572. DOI: 10.1016/j.jece.2013.10.011.
- [6] Elmolla ES, Chaudhuri M. *Desalination.* 2012;285:14-21. DOI: 10.1016/j.desal.2011.09.022.
- [7] Ben W, Qiang Z, Pan X, Chen M. *Water Res.* 2009;43:4392-4402. DOI: 10.1016/j.watres.2009.06.057.
- [8] Kwiecińska A, Konieczny K. The treatment of manure with application of membrane technologies. III Ogólnopolski Kongres Inżynierii Środowiska, 13-17 września 2009 r., Lublin. <http://wis.pol.lublin.pl/kongres3/tom1/15.pdf>.
- [9] Baran W, Adamek E, Sobczak A, Makowski A. *Appl Catal B Environ.* 2009;90:516-525. DOI: 10.1016/j.apcatb.2009.04.014.
- [10] Sukul P, Spitteller M. *Rev Environ Contam Toxicol.* 2006;187:67-101. DOI: 10.1007/0-387-32885-8_2.

PRELIMINARY STUDIES ON DEGRADATION AND MINERALIZATION OF THE SELECTED ANTIBIOTICS BY FENTON METHOD

¹ Department of General and Analytical Chemistry, School of Pharmacy with the Division of Laboratory Medicine
Medical University of Silesia in Katowice, Sosnowiec

² Institute of Occupational Medicine and Environmental Health, Sosnowiec

Abstract: The aim of study was to determine the efficiency of the Fenton method (initiated by small amounts of FeSO_4 and H_2O_2) during the degradation and the mineralization of high doses of ampicillin, doxycycline, tylosin and sulfathiazole. The experiments were carried out in the aquatic environment and in synthetic wastewater prepared in accordance with ISO 9887; 1992 standard. In the experiments, the relationship between efficiency of sulfathiazole degradation and reactants concentrations used in the Fenton method was also determined. It was found that the degradation process was a first order with respect to degraded substrate. It was possible to achieve almost 100% degradation of the selected drugs at low concentrations of FeSO_4 and H_2O_2 . To degrade antibiotics in the aqueous solutions ($0.2 \text{ mmol antibiotic/dm}^3$) the concentrations of FeSO_4 and H_2O_2 were < 0.2 and $< 2 \text{ mmol/dm}^3$, respectively. To degrade antibiotics in synthetic wastewater ($0.2 \text{ mmol antibiotic/dm}^3$) their concentrations were < 1.5 and $< 20 \text{ mmol/dm}^3$, respectively. However, under the experimental conditions, the mineralization of antibiotics solutions was practically not observed despite a significant prolongation of the reaction time. This indicates that these solutions contain stable organic products of drugs transformation having an unknown antibacterial activity.

Keywords: antibiotics, environment, ecotoxicity, toxicity tests