

Urszula Guzik¹, Katarzyna Hupert-Kocurek¹, Danuta Wojcieszńska^{1*}

¹Uniwersytet Śląski w Katowicach, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biochemii
ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice, tel. 32 2009 555, e-mail: biochem@us.edu.pl

Wpłynęło w grudniu 2013 r.

1. Wprowadzenie. 2. Charakterystyka niesteroidowych leków przeciwzapalnych. 3. Degradacja niesteroidowych leków przeciwzapalnych metodami fizyko-chemicznymi. 4. Szlaki biologicznej degradacji niesteroidowych leków przeciwzapalnych. 5. Podsumowanie

Microbial degradation non-steroidal anti-inflammatory drugs

Abstract: In the recent years, commonly used non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are widely detected in the environment. These biologically active substances and their continuous inflow into the environment may lead to their accumulation in the environment and chronic exposure of organisms. This in turn may cause the potential negative effects on living organisms. While the transformation mechanisms of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the human body and in other animals have been extensively studied, degradation of these drugs by bacteria (including their degradation pathways and degradation products) has seldom been investigated and are largely unknown. Therefore, the objective of this paper is presentation actual stage of knowledge about microbiological degradation pathways of NSAIDs such as naproxen, ibuprofen, diclofenac, paracetamol.

1. Introduction, 2. Characterization of non-steroidal anti-inflammatory drugs, 3. Degradation of non-steroidal anti-inflammatory drugs by physicochemical methods, 4. Pathways of biological degradation of non-steroidal anti-inflammatory drugs, 5. Conclusion

Słowa kluczowe: leki przeciwzapalne, degradacja, mikroorganizmy

Key words: anti-inflammatory drugs, degradation, microorganisms

1. Wprowadzenie

W drugiej połowie lat 90 ubiegłego wieku, Terneš [51] opublikował wyniki badań monitorujących stan niemieckich rzek i strumieni pod kątem zawartości w nich pozostałości farmaceutyków. W badanych wodach powierzchniowych stwierdził obecność 32 farmaceutyków i ich metabolitów. Po badaniach przeprowadzonych przez Terneša, informację na temat obecności pozostałości farmaceutyków w wodach powierzchniowych zaczęły docierać do prasy fachowej niemal ze wszystkich części Europy Zachodniej, a także z krajów Ameryki Północnej. Wraz z badaniami monitorującymi stan wód powierzchniowych, dokonano analiz odpływów z oczyszczalni ścieków (ścieków oczyszczonych) oraz ścieków surowych, trafiających na miejskie oczyszczalnie. Zarówno w ściekach surowych, jak i oczyszczonych, wykryte zostały znaczne ilości farmaceutyków, w stężeniach od kilkunastu ng/dm³ do kilkuset µg/dm³ [36, 48].

Głównym źródłem zanieczyszczeń środowiska wodnego farmaceutykami są gospodarstwa domowe oraz szpitale. Leki zażywane przez chorych, nie ulegają całkowicie metabolizmowi w ich organizmach i wraz z moczem lub kałem trafiają do systemu kanalizacji, a stamtąd kierowane są do oczyszczalni ścieków. Oprócz gospodarstw domowych i szpitali, jako następne w kolej-

ności źródła zanieczyszczeń farmaceutykami wymieniane są jednostki diagnostyczne, zakłady farmaceutyczne, a także farmy zwierząt hodowlanych, gdzie podaje się w paszy antybiotyki, aby uchronić zwierzęta hodowlane przed ewentualnymi infekcjami [25, 55]. W ostatnich latach obserwuje się wzrost produkcji farmaceutyków oraz ich nadmiernej konsumpcji. Staje się to poważnym zagrożeniem zwłaszcza dlatego, że farmaceutyki stanowią grupę aktywnych biologicznie i trwałych związków o potencjalnie negatywnym działaniu na różne ekosystemy [4, 11, 17]. Problem związany z obecnością leków w ekosystemach wodnych może się nasilać m.in. za sprawą rosnącej populacji ludzi, produkcji farmaceutyków oraz nadmiernej konsumpcji, zwłaszcza niesteroidowych leków przeciwbólowych i przeciwzapalnych (NLPZ), sięgającej w krajach wysokorozwiniętych nawet kilkuset ton rocznie. Polska jest na piątym miejscu w Europie pod względem ilości sprzedawanych bez recepty NLPZ. Liczbę osób zażywających w Polsce niesteroidowe leki przeciwzapalne szacuje się na około 4 mln [48].

2. Charakterystyka niesteroidowych leków przeciwzapalnych

Właściwości lecznicze substancji pochodzenia naturalnego zawierających salicylany były znane od czasów starożytnych. Już około 3500 lat temu w Egipcie

* Autor korespondencyjny: Uniwersytet Śląski w Katowicach, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biochemii, ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice; tel. 32 2009 454; e-mail: danuta.wojcieszynska@us.edu.pl

stosowano wywar z suszonych liści mirtu jako środek przeciw bolesnym skurczom macicy. Hipokrates zalecał sok z topoli do leczenia chorób oka, a sok z wierzy do łagodzenia bólów porodowych i obniżania gorączki. W 1897 roku Hoffmann i wsp. otrzymali oczyszczoną aspirynę, która była pozbawiona niepożądanych działań, charakterystycznych dla kwasu salicylowego i jego soli. Pod koniec lat 60-tych ubiegłego stulecia odkryto, że lek ten ma również działanie przeciwskrzepowe na skutek nieodwracalnej acetylacji seryny [24, 33].

Obecnie produkowane niesteroidowe leki przeciwzapalne są bardzo zróżnicowane pod względem chemicznym. Do najpopularniejszych zalicza się pochodne kwasu salicylowego, pochodne pirazonu (fenazon, propyfenazon), *para*-aminofenonu (fenacetyna, paracetamol), kwasu fenylooctowego (diklofenak) i propionowego (ibuprofen, ketoprofen, naproksen) [48].

Wg danych Narodowego Instytutu Leków w Warszawie, w 2004 r. w Polsce spożycie ibuprofenu przekroczyło 87,8 ton [13]. Związek ten przez wiele lat stosowany był jedynie w postaci mieszaniny racemicznej, składającej się z równych ilości dwóch form przestrzennych: enancjomeru prawoskrętnego o konfiguracji S, który hamuje cyklooksygenazę, wywołując działanie przeciwbólowe, przeciwgorączkowe i przeciwzapalne oraz enancjomeru lewoskrętnego o konfiguracji R-nieaktywnego farmakologicznie. Obecnie w wielu krajach, również w Polsce, dostępne są preparaty, zawierające tylko aktywny farmakologicznie enancjomer (+)-S. Stosowanie prawoskrętnej formy ibuprofenu pozwoliło zredukować dawkę leku, co zmniejsza ryzyko działań niepożądanych [24]. Z innych popularnych leków przeciwzapalnych na uwagę zasługuje diklofenak. Diklofenak jest unikalnym lekiem należącym do NLPZ, ponieważ hamuje również lipooksygenazę, ograniczając tym samym tworzenie leukotrienów, jednak w środowisku cechuje się wyjątkową trwałością oraz wysoką toksycznością. Spożycie tego związku w 2003 r. wynosiło ponad 21 ton [33, 48, 50].

Mechanizm działania niesteroidowych leków przeciwzapalnych został poznany w roku 1971, kiedy to odkryto ich hamujący wpływ na pierwszy enzym szlaku przemian kwasu arachidonowego – cyklooksygenazy (COX). Jej rola polega na utlenianiu naturalnych lipidów wchodzących w skład błon komórkowych do tzw. cyklicznych nadtlenków, które z kolei ulegają dalszym przemianom, dając trzy grupy aktywnych związków: prostaglandyn, prostacyklin i tromboksanu [24, 33].

Po spożyciu niesteroidowe leki przeciwzapalne są wydalane z organizmu w postaci macierzystej lub w postaci metabolitów. Większość spożywanych farmaceutyków podlega przemianom pierwszej lub drugiej fazy biotransformacji. Faza I zwykle obejmuje reakcje utleniania, redukcji i hydrolizy a produkty tych reakcji są często bardziej aktywne i toksyczne niż forma pierwotna leku. W fazie II metabolity I fazy ulegają syntezie

z kwasem glukuronowym, siarczanami i aminokwasami co prowadzi na ogół do dezaktywacji leku. Reakcje sprzęgania, wskutek podwyższenia rozpuszczalności w wodzie, umożliwiają eliminację leku przez nerki oraz z żółcią. Reakcje zarówno fazy I i II mogą zmienić fizykochemiczne właściwości leku stąd losy metabolitów w środowisku mogą być zupełnie inne – metabolity mają właściwości polarne i wykazują większą rozpuszczalność w wodzie niż leki macierzyste. Ponadto formy sprzężone mogą ulec w środowisku hydrolizie i wrócić do formy macierzystej leku [12, 17, 19, 34, 39, 49].

Ze względu na to, że leki są stale wprowadzane do ekosystemów wodnych (w postaci niezmienionej lub jako aktywne metabolity) nawet w małych stężeniach, to ich pozostałości mogą ulegać kumulacji w organizmach żywych, a tym samym negatywnie oddziaływać na wiele pokoleń. NLPZ nie stwarzają raczej ryzyka wystąpienia ostrej toksyczności u organizmów wodnych, natomiast dane dotyczące skutków ich długotrwałego narażenia na subtoksyczne stężenia są niepełne, a niekiedy sprzeczne [4, 11, 17].

3. Degradacja niesteroidowych leków przeciwzapalnych metodami fizyko-chemicznymi

Obecnie metodami pozwalającymi na trwałe usuwanie NLPZ występujących w wodach powierzchniowych i w ściekach są procesy fotokatalitycznego utleniania (fotodegradacji), chlorynacji, chloraminacji i ozonowania [12, 42, 53, 57]. Metody zaawansowanego utleniania przebiegają najczęściej przy udziale promieniowania UV lub światła słonecznego i w obecności półprzewodników (fotokatalizatorów). Najprawdopodobniej mechanizm tego procesu jest wolnorodnikowy i polega na generowaniu wysoce reaktywnych, a przy tym mało selektywnych rodników hydroksylowych (HO·), należących do jednych z najsilniejszych utleniaczy. Jako katalizatory powszechnie stosuje się tlenki metali, np. TiO₂, ZnO, SnO₂, oraz siarczki, np. ZnS, CdS. Spośród badanych półprzewodników największe zastosowanie ma TiO₂ [46].

Packer i wsp. [37] badali proces degradacji naproksenu, diklofenaku i ibuprofenu w rzece Mississippi pod wpływem światła słonecznego. Okres półtrwania naproksenu w tych warunkach wynosił 42 minuty [Packer i wsp. [37]. Zdecydowanie bardziej fotolabilnym NLPZ okazał się ketoprofen, którego okres półtrwania w rzece Besòs wynosił 2,4 minuty. W początkowym etapie reakcji dochodziło do dekarboksylacji. Powstały (3-etylofenilo)(fenilo)metanon reagował z tlenem i rodnikiem hydroksylowym, w wyniku czego powstawał (3-(1-hydroksyetylo)fenilo)(fenilo)metanon. Związek ten ulegał następnie demetylacji z równoczesnym rozszczepieniem pierścienia aromatycznego. W wyniku tych przemian powstawał 1-feniloetanon [32].

Marotta i wsp. [31] przeprowadzili fotodegradację naproksenu z wykorzystaniem lampy emitującej monochromatyczne światło o długości fali 254 nm. Po 30 minutach naświetlania stwierdzono całkowitą degradację 10^{-5} M naproksenu i obserwowano pojawienie się intermediatów: 1-(6-metoksy-2-naftylo)etanolu lub 2-acetylo-6-metoksynaftalenu.

Buser i wsp. [6] wykorzystali metody fotokatalicznego utleniania podczas usuwania diklofenaku z jeziora Greifensee w Szwajcarii. Wydajność tego procesu oszacowano na 90%. Jednakże proces eliminacji diklofenaku w procesie fotodegradacji może ulec zaburzeniu w obecności jonów azotanowych i kwasów humusowych [5]. Zwiększenie wydajności fotokatalicznego procesu utleniania diklofenaku można osiągnąć poprzez zastosowanie dwutlenku tytanu jako katalizatora. W układzie takim reakcja zachodzi najintensywniej w ciągu 20–40 minut od rozpoczęcia reakcji, kiedy to obserwuje się około 60% ubytek z 50 mg/l wprowadzonego substratu. Reakcja fotooksydacji inicjowana jest poprzez rodnik hydroksylowy, tlen singletowy oraz anionorodnik ponadtlenkowy. Pierwszym produktem fototransformacji diklofenaku jest kwas (8-chloro-9H-karbazolo-1-yl)octowy. Prawdopodobnie w mechanizmie reakcji rodnik hydroksylowy odpowiada za fotokataliczne usunięcie atomu chloru. Wykazano, że reakcje katalizowane w obecności TiO_2 są silnie zależne od pH środowiska [10].

Pierwszym etapem degradacji paracetamolu w układzie UV/ TiO_2 jest atak rodnika hydroksylowego na resztę acetamidową i przekształcenie jej do amidu kwasu szczawiowego. W wyniku tych reakcji powstają hydrochinon i benzochinon, które następnie pod wpływem rodników hydroksylowych przekształcane są do hydroksylowanych produktów [1]. Trovo i wsp. [52] wykazali, że na proces fotokatalicznej degradacji wpływa obecność tlenków żelaza. Prawdopodobnie zwiększona wydajność farmaceutyków w układzie z FeOx związana jest z wysoką kwantową wydajnością tworzenia Fe(II) oraz tworzenia wolnych rodników podczas fotolizy.

Fototransformacja ibuprofenu prowadzi do skracania łańcuchów bocznych. Zaobserwowano jednak, że reakcje zachodzą intensywniej w łańcuchu propanowym niż izobutylovym ibuprofenu [54]. Ruggeri i wsp. [45] wykazali, iż w środowisku wodnym może dochodzić do tworzenia toksycznej pochodnej ibuprofenu – 4-izobutyloacetofenonu na drodze trzech fotochemicznych przemian: bezpośredniej fotolizy, reakcji z rodnikami hydroksylowymi oraz reakcji z rozpuszczalną chromoforową materią organiczną w tripletowym stanie. W Polsce badania nad fotokataliczną degradacją ibuprofenu i kwasu mefenamowego prowadzono w Zakładzie Chemii Ogólnej i Nieorganicznej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego, w wyniku których wykazano całkowitą degradację tych leków metodą fotokatalicz-

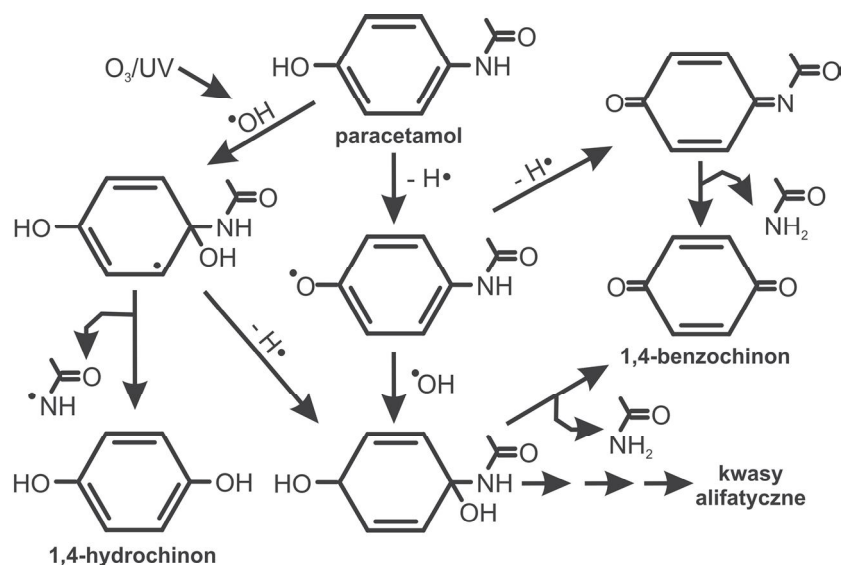
nego utlenienia w obecności TiO_2 jako fotokatalizatora, w ściekach komunalnych [46].

Ze względu na wysoki potencjał oksydacyjny ozonu, ozonowanie znalazło zastosowanie w procesach oczyszczania wód z NLPZ. W procesie tym ozon wprowadzany jest do wody w postaci gazowej, gdzie dochodzi do reakcji pomiędzy nim a materią organiczną [15, 35]. Następnie dekompozycja ozonu do rodnika hydroksylowego prowadzi do dalszego utleniania związków rozpuszczonych w wodzie [15]. Neamtu i wsp. [35] zaobserwowali 51% degradację paracetamolu po zastosowaniu ozonowania, jednakże stwierdzili oni, iż w tym procesie może dochodzić do niecałkowitego utleniania NLPZ i w konsekwencji do powstawania wysoce toksycznych półproduktów. Ponadto w obecności jonów bromkowych podczas ozonowania może dochodzić do tworzenia kancerogennych pochodnych [35, 56].

W celu zwiększenia wydajności degradacji paracetamolu w procesie ozonowania zastosowano promieniowanie UV [20, 58]. Po zastosowaniu tak skonstruowanego układu zaobserwowano pojawienie się 2-hydroksychinonu, acetamidu, benzochinonu i kwasów alifatycznych jako produktów rozkładu paracetamolu (Rys. 1) [35]. Po zastosowaniu ozonowania w obecności dwutlenku tytanu jako katalizatora obserwowano 62% degradację naproksenu [44]. Jednak pomimo dużej efektywności degradacji NLPZ metodami zaawansowanego utleniania procesy te cechują się małą specyficznością, dużymi kosztami jak również mogą być przyczyną niekontrolowanych reakcji rodnikowych w środowisku. Zwykle metody mikrobiologicznej degradacji są bezpieczniejsze i tańsze, jednak problemem jest pozyskanie szczepów mikroorganizmów zdolnych do biodegradacji niesteroidowych leków przeciwpalnych [58].

4. Szlaki biologicznej degradacji niesteroidowych leków przeciwpalnych

Alternatywą dla procesów fizyko-chemicznego oczyszczania wód z NLPZ jest bioremediacja ze względu na niższe koszty i mineralizację NLPZ do nietoksycznych produktów [2]. Jednak według testów biodegradacyjnych zalecanych przez Organizację Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (OECD) jedynie paracetamol i pochodne kwasu salicylowego są uznane jako związki biodegradowalne przez osad czynny. Ze względu na niską biodegradowalność NLPZ od kilku lat prowadzone są badania nad intensyfikacją procesów degradacyjnych z udziałem osadu czynnego. Częściowym sukcesem zakończyły się badania Quintana i wsp. [40] nad rozkładem ibuprofenu, ketoprofenu, naproksenu i diklofenaku przez osad czynny. Degradacja ketoprofenu prowadziła do dwóch metabolitów: kwasu 3-(hydroksykarboksymetylo)-hydratopowego

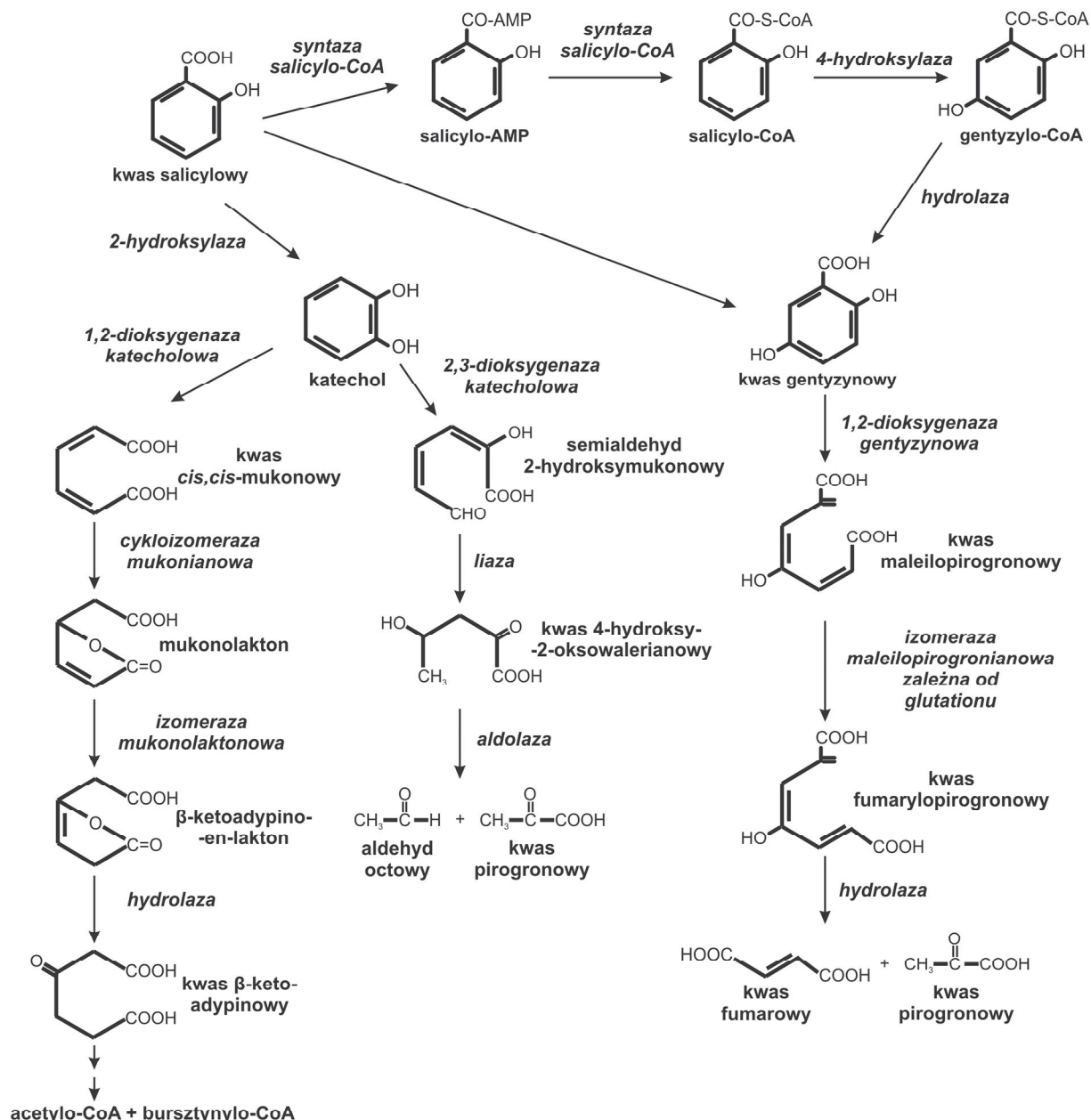
Rys. 1. Degradacja paracetamolu metodą O_3/UV [20, 35]

oraz kwasu 3-(ketokarboksymetylo)-hydratopowego. Identyfikacja tych produktów była podstawą do zaproponowania przez nich szlaku degradacji tego związku. Prawdopodobnie powstałe kwasy ulegają kolejnym przemianom prowadzącym do całkowitej mineralizacji. Zaproponowano drogę rozkładu ketoprofenu wspólnym szlakiem degradacji bifenyli, ich eterów i innych pochodnych bifenyli. Pierwszym etapem degradacji tego związku jest redukcja grupy ketonowej do hydroksylowej. W wyniku redukcji grupy ketonowej do grupy hydroksylowej otrzymany produkt charakteryzuje się większą gęstością elektronową i jest bardziej podatny na elektrofilowy atak tlenu podczas następnego etapu – dioksygenacji, w wyniku której powstaje związek z ugrupowaniem katecholowym umożliwiającym atak dioksygenaz rozszczepiających. W wyniku *meta* rozszczepienia powstaje pochodna semialdehydu hydroksymukonowego. W dalszym etapie intermediat ten ulega hydrolizie, w wyniku której powstaje kwas α -hydroksypentadienowy oraz kwas 3-(hydroksykarboksymetylo)hydratopowy, którego drugorzędowa grupa hydroksylowa ulega utlenieniu, w wyniku czego powstaje kwas 3-(ketokarboksymetylo)-hydratopowy [40]. Ponadto Quintana i wsp. [40] i Kosjek i wsp. [27] obserwowali transformację ibuprofenu do dwóch izomerów hydroksyibuprofenu oraz demetylację naproksenu.

Kosjek i wsp. [26,27] zidentyfikowali metabolity transformacji diklofenaku przez czynny. Zaobserwowali, że pierwszy etap degradacji diklofenaku prowadził do utworzenia hydroksyl- i metoksy pochodnej diklofenaku. W dalszym etapie następowała dehydratacja i przekształcenie w laktam: 1-(2,6-dichlorofenilo)-1,3-dihydro-2H-indolo-2-on. Analiza produktu z wykorzystaniem LC-MS wykazała obecność dwóch metabolitów o wzorze sumarycznym $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{NCl}_2$. Zaproponowano, że są to formy izomeryczne 2,6-dichloro-N-(fenilo)aniliny [26].

Na procesy degradacji NLPZ przez osad czynny wpływa jego wiek [57]. W bioreaktorze przepływowym z 200-dniowym osadem czynnym obserwowano całkowitą degradację paracetamolu i ibuprofenu oraz 79–96% degradację ketoprofenu i naproksenu. Pomimo wykorzystania metody osadu czynnego w oczyszczaniu ścieków z NLPZ, leki te są wykrywane na wypływach z oczyszczalni [14, 41, 49]. Z tego względu w ostatnich latach zwraca się uwagę na integrację metod chemicznego i biologicznego utleniania związków toksycznych. Cielho i wsp. [9] podjęli próbę podwyższenia biodegradowalności diklofenaku przez osad czynny poprzez wcześniejsze ozonowanie. Wykazali, że godzinne ozonowanie powodowało zwiększoną podatność intermediatów na procesy biologicznego utleniania. Równocześnie nie stwierdzono negatywnego wpływu ozonowania na funkcjonowanie osadu czynnego. Być może integracja biologicznego i chemicznego utleniania NLPZ jest alternatywą dla klasycznych metod oczyszczania ścieków.

W celu zoptymalizowania procesów biodegradacji dąży się do pozyskania metodami racjonalnego skринingu mikroorganizmów o zwiększonych zdolnościach degradacyjnych oraz opisanie dróg metabolicznych rozkładu NLPZ. Najlepiej poznano i opisano drogi rozkładu salicylanów ze względu na ich naturalne pochodzenie. W roku 1972 Chakrabarty [7] opisał genetyczne podstawy procesu biodegradacji salicylanów przez szczep *Pseudomonas putida* R1. Salicylany mogą być rozkładane poprzez dwa kluczowe metabolity: katechol oraz kwas gentyzynowy. Powstały w wyniku hydroksylacji salicylanów katechol ulega rozszczepieniu drogą *orto* lub *meta*. Za pierwszy etap rozkładu szlakiem *orto* odpowiada 1,2-dioksygenaza katecholowa, która utlenia katechol do kwasu *cis,cis*-mukonowego. W dalszym etapie dochodzi do laktonizacji pierścienia, a następnie izomeryzacji. Powstały lakton kwasu β -ketoadypinowego

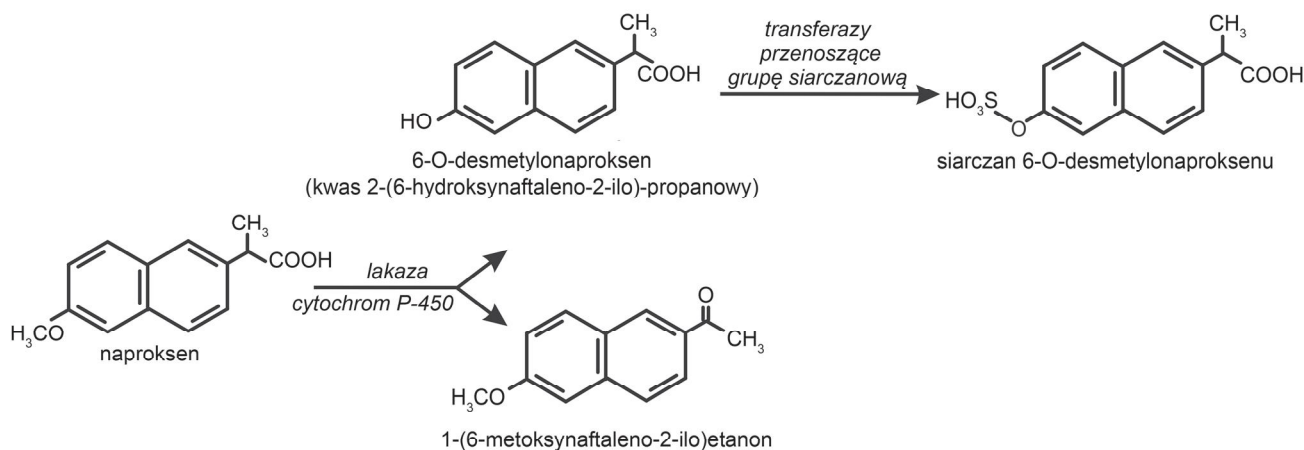


Rys. 2. Mikrobiologiczna degradacja salicylanu [21, 22, 23, 60]

ulega hydrolizie do kwasu β -ketoadypinowego, który jest włączany do centralnego metabolizmu, w wyniku czego uzyskuje się końcowe produkty: kwas bursztynowy i acetylo-CoA. W szlaku *meta* katechol ulega rozszczepieniu z udziałem 2,3-dioksygenazy do semialdehydu 2-hydroksymukonowego. Intermediat ten ulega następnie lizie do kwasu 4-hydroksy-2-ketowalerianowego, który następnie ulega rozszczepieniu do acetaldehydu kwasu pirogronowego [7, 47]. Rozkład salicylanu poprzez gentyzynian rozpoczyna się hydroksylacją z udziałem 4-hydroksylazy. Powstały kwas gentyzynowy ulega rozszczepieniu z udziałem 1,2-dioksygenazy gentyzynowej do maleilopirogronianu, który podlega następnie redukcji z udziałem izomerazy maleilopirogronianu zależnej od glutationu. Powstały fumarylo-

pirogronian hydrolizuje do pirogronianu i fumaranu [38, 60]. Ishiyama i wsp. [21] opisali szlak rozkładu salicylanów przez szczep *Streptomyces* sp. WA46. W pierwszym etapie tego szlaku dochodzi do konwersji salicylanu do salicylo-CoA poprzez salicylo-AMP jako intermediat. Salicylo-CoA ulega następnie utlenieniu do gentyzylo-CoA. W wyniku hydrolizy CoA powstaje gentyzynian, którego rozkład przebiega opisanym powyżej szlakiem kwasu gentyzynowego [21]. Szlaki mikrobiologicznej degradacji salicylanów przedstawiono na rysunku 2.

Rozkład salicylanów obserwowano również przez grzyby *Aspergillus*, *Fusarium*, *Neurospora* i drożdże. Przebiega on podobnie jak u bakterii poprzez katechol lub kwas gentyzynowy. Jednak istnieją również szczepy



Rys. 3. Mikrobiologiczna degradacja naproksenu [29, 43]

grzybów cechujące się odmiennym metabolizmem salicylanów. Grzyb *Neurospora crassa* redukuje salicylany do saligenin [38]. Natomiast *Trichosporon moniliiforme* inicjuje rozkład salicylanu dekarboksylacją do fenolu. Ulega on następnie utlenieniu do katecholu i rozszczepieniu *orto* do kwasu *cis,cis*-mukonowego [23].

Niesteroidowe leki przeciwzapalne będące pochodnymi kwasu antranilowego, heterocykliczne i arylowe pochodne kwasu octowego lub kwasu propionowego oraz pochodne kwasów enolowych są trudno degradable ze względu na ich strukturę. Dotychczas opisano jedynie kilka mikroorganizmów, głównie grzybów (*Penicillium*, *Trametes versicolor*, *Cunninghamella elegans*, *C. echinulata*, *C. blakeslesna*, *Beauveria bassiana*, *Phanerochaete chrysosporium*, *P. sordida*, *Actinoplanes* sp., *Bjerkandera* sp. R1, *Bjerkandera adusta*, *Irpex lacteus*, *Ganoderma lucidum*), zdolnych do ich transformacji bądź degradacji [17, 18, 28, 30, 41, 42]. W 1975 roku Hart i Orr [18] opisali szczep *Penicillium* metabolizujący paracetamol do octanu i 4-aminofenolu, jednak ten ostatni nie ulegał dalszej degradacji.

Marco-Urrea i wsp. [30] opisali rozkład ketoprofenu przez grzyby *Trametes versicolor*. W pierwszy etap transformacji zaangażowane są prawdopodobnie monoooksygenazy cytochromu P450. Głównym produktem hydroksylacji jest kwas 2-[(3-hydroksy(fenilo)metylo)fenylo]-propanowy, w mniejszych stężeniach powstaje kwas 2-[3-(4-hydroksybenzoilo)fenylo]-propanowy oraz kwas 2-(3-benzoilo-4-hydroksyfenylo)-propanowy. Prawdopodobnie powstałe kwasy ulegają kolejnym przemianom prowadzącym do całkowitej mineralizacji. Uważa się, iż monoooksygenaza cytochromu P450 wraz z lakazą są zaangażowane w transformację naproksenu do kwasu 2-(6-hydroksynaftaleno-2-ilo)-propanowego oraz 1-(6-metoksynaftaleno-2-ilo)-etanonu (Rys. 3) [29, 43]. Lore i wsp. [28] wykorzystali komercyjną laktazę izolowaną z *Myceliophthora thermophila* w degradacji diklofenaku i naproksenu uzyskując 100% rozkład diklofenaku. Uzyskanie identycznej

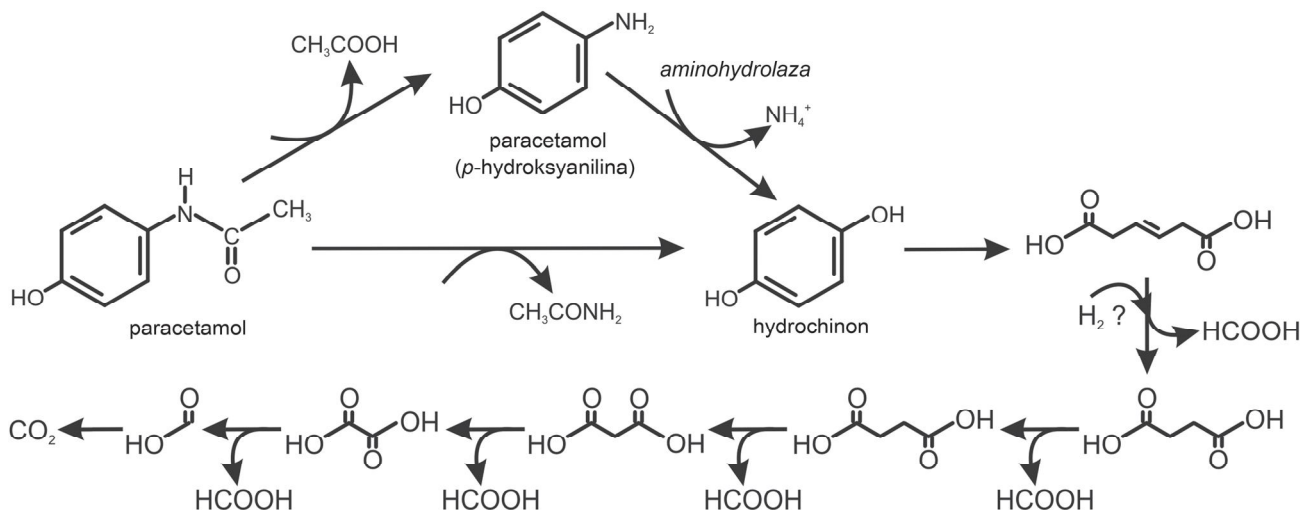
wydajności podczas rozkładu naproksenu wymagało zastosowania mediatora redoks [28].

Rodarte-Morales i wsp. [41] badali degradację diklofenaku, naproksenu i ibuprofenu z udziałem grzybów białej zgnilizny: *Bjerkandera* sp. R1, *B. adusta* i *Phanerochaete chrysosporium*. Grzyby *P. chrysosporium* przeprowadzały całkowitą degradację naproksenu, natomiast diklofenak rozkładany był przez *Bjerkandera* sp. R1, *P. chrysosporium* i *B. adusta* z wydajnością wynoszącą odpowiednio 99%, 77% i 9%. Ibuprofen rozkładany był przez wszystkie badane grzyby z wydajnością ponad 70% [41, 42].

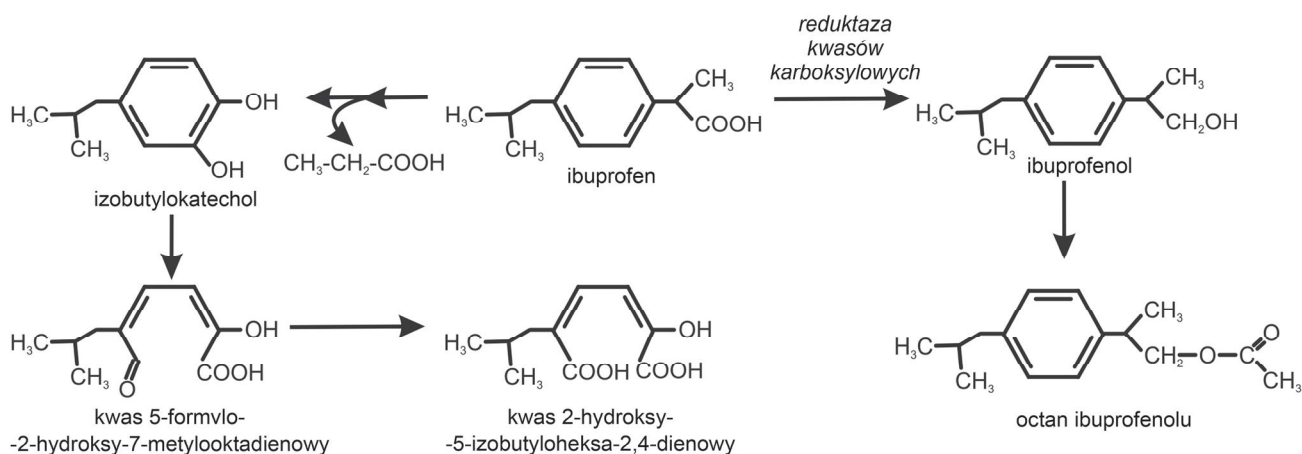
Do nielicznych bakterii rozkładających NLPZ należą szczepy z rodzajów *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Patulibacter*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas* [2-4, 8, 16, 22, 34, 55, 58]. Do tej pory nie opisano degradacji naproksenu i diklofenaku przez izolowane szczepy bakterii.

Ivshina i wsp. [22] opisali degradację paracetamolu przez bakterie z rodzaju *Rhodococcus* drogą poprzez *para*-aminofenol, pirokatechol i hydrochinon. Po 20-dniach obserwowano całkowitą degradację tego leku. Innymi szczepami rozkładającymi paracetamol są *Stenotrophomonas* sp. f1, *Pseudomonas* sp. f2 i fg-2, *Pseudomonas* sp. STI i *P. aeruginosa* [2, 16, 58]. Podczas degradacji z udziałem tych szczepów, w pierwszym etapie dochodzi do uwolnienia octanu i powstania aminofenolu. Proces ten zachodzi z udziałem aminohydrolazy. Grupa aminowa powstałego aminofenolu ulega podstawieniu grupą hydroksylową z utworzeniem hydrochinonu. Następnie pierścień aromatyczny ulega rozszczepieniu do karboksykwasy: 2-heksenowego, bursztynowego, malonowego, szczawowego i mrówkowego natomiast wolna grupa aminowa ulega utlenieniu do azotanów (III), a następnie azotanów (V) (Rys. 4) [58].

Do nielicznych bakterii rozkładających ibuprofen należą szczepy *Shingomonas* sp. Ibu-2, *Patulibacter* I11 i *Nocardia* sp. NRRL 5646, jednak niewiele wiadomo o biochemii rozkładu tego związku [3, 8, 34]. *Nocardia*



Rys. 4. Mikrobiologiczna degradacja paracetamolu [58]



Rys. 5. Mikrobiologiczna degradacja ibuprofenu [8, 34]

sp. NRRL 5646 redukuje karboksylową grupę funkcyjną ibuprofenu do grupy alkoholowej. Powstała grupa hydroksylowa jest następnie estryfikowana z wytworzeniem octanu ibuprofenolu (Rys. 5) [8].

W pierwszym etapie rozkładu ibuprofenu przez szczep *Shingomonas* sp. Ibu-2 następuje odszczepienie łańcucha propionowego z równoczesną dioksygenacją w pozycji 1,2, w wyniku czego powstaje izobutylokatechol. Intermediat ten ulega *meta*-rozszczerpieniu, a powstały kwas 5-formylo-2-hydrokso-7-metylooktadienowy jest utleniany do kwasu 2-hydrokso-5-izobutyloheksa-2,4-dienowego (Rys. 5) [34].

5. Podsumowanie

Przedstawiony przegląd wskazuje, że pomimo licznych prób biodegradacji NLPZ z zastosowaniem mikroorganizmów, problem tych związków w środowisku nadal jest nierozwiązany. Jest to tym bardziej niepokojące, że problem ten będzie narastać ze względu na wzrost

populacji ludzkiej i coraz większe zużycie tych leków a z drugiej na brak skutecznych metod ich degradacji. Być może rozwiązaniem byłoby zastosowanie zintegrowanych procesów chemicznego i biologicznego utleniania. Obecnie metody te znalazły zastosowanie w intensyfikacji procesów rozkładu szczególnie trwałych związków jak np. kwas pikrynowy. Jedną z najpopularniejszych metod stosowanych w zintegrowanych procesach utleniania jest ozonowanie, w wyniku którego powstają hydroksylowe pochodne podatne na działanie enzymów degradacyjnych. Ze względu na wysoką wydajność zintegrowanych systemów chemicznego i biologicznego utleniania oraz ich stosunkowo niski koszt wydaje się, że procesy te mogą znaleźć zastosowanie w technologiach oczyszczania środowisk z NLPZ na szerszą skalę.

Piśmiennictwo

1. Aguilar C.A., Montalvo C., Ceron J.G., Moctezuma E., Photocatalytic degradation of acetaminophen. *Int. J. Environ. Res.* 5, 1071–1078 (2011)

2. Ahmed S., Javed M.A., Tanvir S., Hameed A.: Isolation and characterization of a *Pseudomonas* strain that degrades 4-acetamidophenol and 4-aminophenol. *Biodegradation*, **12**, 303–309 (2001)
3. Almeida B., Kjeldal H., Lolas I., Knudsen A.D., Carvalho G., Nielsen K.L., Barreto Crespo M.T., Stensballe A., Nielsen J.L.: Quantitative proteomic analysis of ibuprofen-degrading *Patulibacter* sp. strain I11. *Biodegradation*, **24**, 615–630 (2013)
4. Almeida B., Oehmen A., Marques R., Brito D., Carvalho G., Barreto Crespo M.T.: Modelling the biodegradation of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) by activated sludge and a pure culture. *Biores. Technol.* **133**, 31–37 (2013)
5. Andreozzi R., Faffaele M., Nicklas P.: Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere*, **50**, 1319–1330 (2003)
6. Buser H.R., Poiger T., Müller M.D.: Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenac in surface waters: rapid photodegradation in a lake. *Environ. Sci. Technol.* **32**, 3449–3456 (1998)
7. Chakrabarty A.M.: Genetic basis of the biodegradation of salicylate in *Pseudomonas*. *J. Bacteriol.* **112**, 815–823 (1972)
8. Chen Y., Rosazza J.P.N.: Microbial transformation of ibuprofen by a *Nocardia* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1292–1296 (1994)
9. Coelho A.D., Sans C., Agüera A., Gómez M.J., Esplugas S., Dezotti M.: Effects of ozone pre-treatment on diclofenac: intermediates, biodegradability and toxicity assessment. *Sci. Total Environ.* **407**, 3572–3578 (2009)
10. Czech B., Rubinowska K.: TiO₂-assisted photocatalytic degradation of diclofenac, metoprol, estrone and chloramphenicol as endocrine disruptors in water. *Adsorption*, **19**, 619–630 (2013)
11. Epold I., Dulova N., Trapido M.: Degradation of diclofenac in aqueous solution by homogeneous and heterogeneous photolysis. *J. Environ. Eng. Ecol. Sci.*, DOI <http://dx.doi.org/10.7243/2050-1323-1-3> (2012)
12. Escher B.I., Fenner K.: Recent advances in environmental risk assessment of transformation products. *Environ. Sci. Technol.* **45**, 3835–3847 (2011)
13. Felis E., Miksch K.: Removal of analgesic drugs from the aquatic environment using photochemical methods. *Water Sci. Technol.* **60**, 2253–2259 (2009)
14. Ferrando-Climent L., Collado N., Buttiglieri G., Gros M., Rodriguez-Roda L., Rodriguez-Mozaz S., Barcelo D.: Comprehensive study of ibuprofen and its metabolites in activated sludge batch experiments and aquatic environment. *Sci. Total Environ.* **438**, 404–413 (2012)
15. Gromadzka K., Nawrocki J.: Degradation of diclofenac and clofibric acid using ozone-loaded perfluorinated solvent. *Ozone Sci. Eng.* **28**, 85–94 (2006)
16. Gussem B.D., Vanhaecke L., Verstraete W., Boon N.: Degradation of acetaminophen by *Delftia tsuruhatensis* and *Pseudomonas aeruginosa* in a membrane bioreactor. *Water Res.* **45**, 1829–1837 (2011)
17. Guzik U., Hupert-Kocurek K., Mazur A., Wojcieszynska D.: Bio-transformacja wybranych niesteroidowych leków przeciwzapalnych w środowisku. *Bromat. Chem. Toksykol.* **46**, 105–112 (2013)
18. Hart A., Orr D.L.J.: The degradation of paracetamol (4-hydroxyacetanilide) and other substituted acetanilides by a *Penicillium* species. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* **41**, 239–247 (1975)
19. Hashim N.H., Nghiem L.D., Stuetz R.M., Khan S.J.: Enantiospecific fate of ibuprofen, ketoprofen and naproxen in a laboratory-scale membrane bioreactor. *Water Res.* **45**, 6249–6258 (2011)
20. Illes E., Takacs E., Dombi A., Gajda-Schrantz K., Racz G., Gonter K., Wojnarovits L.: Hydroxyl radical induced degradation of ibuprofen. *Sci. Total Environ.* **447**, 286–292 (2013)
21. Ishiyama D., Vujaklija D., Davies J.: Novel pathway of salicylate degradation by *Streptomyces* sp. strain WA46. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 1297–1306 (2004)
22. Ivshina I.B., Rychkova M.I., Vikhareva E.V., Chekryshkina L.A., Mishenina I.I.: Catalysis of the biodegradation of unusable medicines by alkanotrophic *Rhodococci*. *Appl. Biochem. Microbiol.* **42**, 392–395 (2006)
23. Iwasaki Y., Gunji H., Kino K., Hattori T., Ishii Y., Kirimura K.: Novel metabolic pathway for salicylate biodegradation via phenol in yeast *Trichosporon moniliiforme*. *Biodegradation*, **21**, 557–564 (2010)
24. Karaźniewicz M.: Czterdzieści lat doświadczeń stosowania ibuprofenu w lecznictwie. *Now. Lek.* **76**, 195–197 (2007)
25. Kosjek T., Heath E., Kompare B.: Removal of pharmaceutical residues in a pilot wastewater treatment plant. *Anal. Bioanal. Chem.* **387**, 1379–1387 (2007)
26. Kosjek T., Heath E., Pérez S., Petrović M., Barceló D.: Metabolism studies of diclofenac and clofibric acid in activated sludge bioreactors using liquid chromatography with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J. Hydrol.* **372**, 109–117 (2009)
27. Kosjek T., Heath E., Petrović M., Barceló D.: Mass spectrometry for identifying pharmaceutical biotransformation products in the environment. *Trends Anal. Chem.* **26**, 1076–1085 (2007)
28. Lloret L., Eibes G., Lu-Chau T.A., Moreira M.T., Feijoo G., Lema J.M.: Laccase-catalyzed degradation of anti-inflammatories and estrogens. *Biochem. Eng. J.* **51**, 124–131 (2010)
29. Marco-Urrea E., Perez-Trujillo M., Blanquez P., Vicent T., Caminal G.: Biodegradation of the analgesic naproxen by *Trametes versicolor* and identification of intermediates using HPLC-DAD-MS and NMR. *Biores. Technol.* **101**, 2159–2166 (2010)
30. Marco-Urrea E., Perez-Trujillo M., Cruz-Morato C., Caminal G., Vicent T.: White-rot fungus-mediated degradation of the analgesic ketoprofen and identification of intermediates by HPLC-DAD-MS and NMR. *Chemosphere*, **78**, 474–481 (2010)
31. Marotta R., Spasiano D., Somma I.D., Andreozzi R.: Photodegradation of naproxen and its photoproducts in aqueous solution at 254 nm: a kinetic investigation. *Water Res.* **47**, 373–383 (2013)
32. Matamoros V., Duhec A., Albaigés J., Bayona J.M.: Photodegradation of carbamazepine, ibuprofen, ketoprofen and 17 α -ethinylestradiol in fresh and seawater. *Water Air Soil Pollut.* **196**, 161–168 (2009)
33. Międzybrodzki R.: Kierunki poszukiwań i zastosowanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych. *Post. Hig. Med. Dośw.* **58**, 438–448 (2004).
34. Murdoch R.W., Hay A.G.: Formation of catechols via removal of acid side chains from ibuprofen and related aromatic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 6121–6125 (2005)
35. Neamtu M., Bobu M., Kettrup A., Siminiceanu I.: Ozone photolysis of paracetamol in aqueous solution. *J. Environ. Sci. Health A*, **48**, 1264–1271 (2013)
36. Nikolaou A., Meric S., Fatta D.: Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Anal. Bioanal. Chem.* **387**, 1225–1234 (2007)
37. Packer J.L., Werner J.J., Latch D.E., McNeill K., Arnold W.A.: Photochemical fate of pharmaceuticals in the environment: naproxen, diclofenac, clofibric acid, and ibuprofen. *Aquat. Sci.* **65**, 342–351 (2003)
38. Penn C.D., Daniel S.L.: Salicylate degradation by the fungal plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Curr. Microbiol.* **67**, 218–225 (2013)
39. Perez S., Barcelo D.: First evidence for occurrence of hydroxylated human metabolites of diclofenac and aceclofenac in wastewater using QqLIT-MS and QqTOF-MS. *Anal. Chem.* **80**, 8135–8145 (2008)

40. Quintana J.B., Weiss S., Reemtsma T.: Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor. *Water Res.* **39**, 2654–2664 (2005)
41. Rodarte-Morales A.I., Feijoo G., Moreira M.T., Lema J.M.: Biotransformation of three pharmaceutical active compounds by the fungus *Phanerochaete chrysosporium* in a fed batch stirred reactor under air and oxygen supply. *Biodegradation*, **23**, 145–156 (2012)
42. Rodarte-Morales A.I., Feijoo G., Moreira M.T., Lema J.M.: Degradation of selected pharmaceutical and personal care products (PPCPs) by white-rot fungi. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 1839–1849 (2011)
43. Rodriguez-Rodriguez C.E., Marco-Urrea E., Caminal G.: Naproxen degradation test to monitor *Trametes versicolor* activity in solid-state bioremediation processes. *J. Hazard. Mater.* **179**, 1152–1155 (2010)
44. Rosal R., Rodriguez A., Gonzalo M.S., Garcia-Calvo E.: Catalytic ozonation of naproxen and carbamazepine on titanium dioxide. *Appl. Catal. B-Environ.* **84**, 48–57 (2008)
45. Ruggeri G., Ghigo G., Maurino V., Minero C., Vione D.: Photochemical transformation of ibuprofen into harmful 4-isobutyacetophenone: pathways, kinetics, and significance for surface waters. *Water Res.* **47**, 6109–6121 (2013)
46. Rzepa J.: Oznaczanie leków i pestycydów w wodach powierzchniowych (w) Postępy Chromatografii, red. B.K. Głód, Wydawnictwo Akademii Podlaskiej, Siedlce, 2009, s. 67
47. Silva T.R., Valdman E., Valdman B., Leite S.G.F.: Salicylic acid degradation from aqueous solutions using *Pseudomonas fluorescens* HK44: parameters studies and application tools. *Braz. J. Microbiol.* **38**, 39–44 (2007)
48. Sosnowska K., Styszko-Grochowiak K., Gołaś J.: Leki w środowisku – źródła, przemiany, zagrożenia. Krakowska Konferencja Młodych Uczonych 2009
49. Stülten D., Zühlke S., Lamshöft M., Spitteller M.: Occurrence of diclofenac and selected metabolites in sewage effluents. *Sci. Total Environ.* **405**, 310–316 (2008)
50. Szymonik A., Lach J.: Zagrożenie środowiska wodnego obecnością środków farmaceutycznych. *Inżynieria i Ochrona Środowiska*, **15**, 249–263 (2012)
51. Ternes T.: Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res.* **32**, 3245–3260 (1998)
52. Trovó A.G., Melo S.A.S., Nogueira R.F.P.: Photodegradation of the pharmaceuticals amoxicillin, bezafibrate and paracetamol by the photo-Fenton process-application to sewage treatment plant effluent. *J. Photochem. Photobiol. A*, **198**, 215–220 (2008)
53. Veach A., Bernot M.J., Mitchell J.K.: The influence of six pharmaceuticals on freshwater sediment microbial growth incubated at different temperatures and UV exposures. *Biodegradation*, **23**, 497–507 (2012)
54. Vione D., Maddigapu P.R., De Laurentis E., Minella M., Pazzi M., Maurino V., Minero C., Kouras S., Richard C.: Modelling the photochemical fate of ibuprofen in surface waters. *Water Res.* **45**, 6725–6736 (2011)
55. Wu S., Zhang L., Chen J.: Paracetamol in the environment and its degradation by microorganism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **96**, 875–884 (2012)
56. Yu H., Nie E., Xu J., Yan S., Cooper W.J., Song W.: Degradation of diclofenac by advanced oxidation and reduction processes: kinetic studies, degradation pathways and toxicity assessments. *Water Res.* **47**, 1909–1918 (2013)
57. Yu T.H., Lin A.Y.Ch., Lateef S.K., Lin Ch.F., Yang P.Y.: Removal of antibiotics and non-steroidal anti-inflammatory drugs by extended sludge age biological process. *Chemosphere*, **77**, 175–181 (2009)
58. Zhang L., Hu J., Zhu R., Zhou Q., Chen J.: Degradation of paracetamol by pure bacterial cultures and their microbial consortium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 3687–3698 (2013)
59. Zhang Y., Geissen S.U., Gal C.: Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere*, **73**, 1151–1161 (2008)
60. Zhou N.-Y., Fuenmayor S.L., Williams P.A.: *nag* Genes of *Ralstonia* (formerly *Pseudomonas*) sp. strain U2 encoding enzymes for gentisate catabolism. *J. Bacteriol.* **183**, 7000–7008 (2001)