

**„Preparat stymulujący degradację niesteroidowych leków przeciwzapalnych w oparciu o immobilizowane na naturalnym nośniku szczepy bakterii”**

Umowa nr TANGO-IV-A/0049/2019-00

**Preparat  
mikrobiologiczny  
do rozkładu NLPZ**



**NAZWA TECHNOLOGII (KNOW HOW)**

Preparat mikrobiologiczny oparty na immobilizowanych mikroorganizmach wspomagający pracę osadu czynnego oczyszczalni ścieków w usuwaniu niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) oraz fenoli.

**OPIS TECHNOLOGII, USŁUGI LUB WYNIKÓW BADAŃ (STRESZCZENIE)**

W ostatnich latach wzrasta zainteresowanie biologicznymi metodami oczyszczania ścieków, przede wszystkim ze względu na ich proekologiczny charakter i niskie koszty produkcji i stosowania. Jednak istnieje grupa zanieczyszczeń odpornych na mikrobiologiczną degradację. Należą do nich farmaceutyki oraz fenole, które negatywnie oddziałują na organizmy żywe. Problemem jest jednak przeżywalność introdukowanych mikroorganizmów w warunkach osadu czynnego.

W opracowanym preparacie wykorzystano w pełni potencjał degradacyjny mikroorganizmów immobilizowanych szczepów bakterii do rozkładu NLPZ oraz wysokich stężeń fenolu. Zastosowanie nośnika w postaci naturalnej gąbki roślinnej z *Luffa cylindrica* umożliwia rozwiązanie problemu przeżywalności szczepów introdukowanych do mikrobiomu osadu czynnego. Uzyskany w ten sposób preparat można stosować do wspomagania procesów oczyszczania ścieków.

**SŁOWA KLUCZOWE**

biopreparat, NLPZ, fenole, immobilizowane bakterie, degradacja

**OPIS ASPEKTÓW INNOWACYJNYCH**



**„Preparat stymulujący degradację niesteroidowych leków przeciwzapalnych w oparciu o immobilizowane na naturalnym nośniku szczepów bakterii”**

Umowa nr TANGO-IV-A/0049/2019-00

Obecnie na rynku nie ma mikrobiologicznego preparatu służącego do usuwania NLPZ ze ścieków. Dostępne preparaty, niespełniające w pełni powyżej wymienionych kryteriów, są niewystarczające do oczyszczania ścieków obciążonych wysokimi stężeniami fenoli.

Przedmiotowy preparat jest produktem kompleksowym, zawierającym w swoim składzie szczep *Stenotrophomonas maltophilia* KB2, który jest szczepem zdolnym do rozkładu szerokiej gamy fenoli, w tym tak trudno degradable i wysoce toksycznych chloro- i nitrofenoli. Ponadto szczep ten zdolny jest również do rozkładu ekstremalnie wysokich stężeń fenolu (1 kg/m<sup>3</sup>). Preparat o takim składzie umożliwia rozkład najpopularniejszych niesteroidowych leków przeciwzapalnych takich jak ibuprofen, paracetamol, naproksen i diklofenak dzięki zastosowaniu wyspecjalizowanych w degradacji tych związków szczepów bakterii.

Nowością jest zastosowanie naturalnego, nietoksycznego, niedrogiego i biodegradowalnego nośnika, jakim jest gąbka roślinna z *Luffa cylindrica*, do immobilizacji bakterii o wysokim potencjale degradacyjnym związków aromatycznych. Zastosowanie takiego nośnika zwiększa szanse przeżycia zaimmobilizowanych mikroorganizmów w środowisku konkurencyjnych mikroorganizmów osadu czynnego. Ponadto nośnik działa ochronnie dla mikroorganizmów, w związku z tym są one mniej wrażliwe na zmieniające się warunki otoczenia oraz toksyczne działanie zanieczyszczeń. Dodatkowo biodegradowalność nośnika gwarantuje, iż po zastosowaniu preparatu nie będzie on zalegał w elementach instalacji oczyszczalni ścieków, generując kosztów czyszczenia i konserwacji ani przerw w funkcjonowaniu przedsiębiorstwa.

#### OPIS GŁÓWNYCH ZALET

- duża skuteczność w usuwaniu paracetamolu, ibuprofenu, naproksenu i diklofenaku
- oporność na toksyczne związki obecne w ściekach
- kompleksowość składu
- bezpieczny i tani nośnik zapewniający przeżywalność bakterii (z możliwością wzmocnienia syntetycznym dodatkiem)

#### OPIS ZASTOSOWANIA RYNKOWEGO

Do głównych odbiorców przedmiotowego rozwiązania należeć będą w szczególności:

- oczyszczalnie ścieków komunalnych;
- oczyszczalnie przy zakładach przemysłowych, w tym przemysłu farmaceutycznego, papierniczego, drzewnego, chemicznego;
- samorządy miast odpowiedzialne za przeprowadzanie rekultywacji zbiorników wodnych,
- inwestorzy branżowi – firmy zajmujące się produkcją i dostarczaniem preparatów do oczyszczalni ścieków oraz usług w zakresie rekultywacji terenów,
- inwestorzy indywidualni posiadający zbiorniki bezodpływowe lub przydomowe oczyszczalnie ścieków.



**„Preparat stymulujący degradację niesteroidowych leków przeciwzapalnych w oparciu o immobilizowane na naturalnym nośniku szczepu bakterii”**

Umowa nr TANGO-IV-A/0049/2019-00

**OPIS METODOLOGII BADAŃ**

W badaniach zostały wykorzystane bakterie z kolekcji szczepów Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach: *Bacillus thuringiensis* B1, degradujący naproksen i ibuprofen, *Pseudomonas moorei* KB4 degradujący paracetamol i diklofenak oraz *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 i *Planococcus* sp. S5 zdolne do rozkładu fenoli. Inokulum do immobilizacji stanowiły zawiesiny badanych szczepów bakteryjnych.

Szczep *Bacillus thuringiensis* B1 namnażany był w pożywce HCT. Szczepy S5 oraz KB2 namnażane były w bulionie odżywczym odpowiednio przez 72 i 24 godziny, w 30°C, w warunkach wytrząsania. Szczep KB4 namnażany był w pożywce LB przez 24 godziny w 30°C, w warunkach wytrząsania. Następnie, namnożone hodowle były zwirowywane (5000g, 4°C, 15 min) i zawieszane w jałowej minimalnej pożywce mineralnej (MSM) o składzie: 3,78 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12H<sub>2</sub>O, 0,5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 g/L NH<sub>4</sub>Cl, 0,2 g/L MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O oraz 0,01 g/L ekstraktu drożdżowego. Gąbki Loofah suszone były w eksykatorze w celu ustalenia suchej masy. Z tak przygotowanego materiału zostały uformowane prostopadłościanny o wadze 150 mg±10 mg. Uzyskane nośniki następnie dwukrotnie zostały przepłukane w wodzie destylowanej oraz wysterylizowane (121°C, 1,2 atm, 20 min).

W celu immobilizacji komórek szczepu S5 - 0,75 g gąbki Loofah inkubowane było w 100 ml zawiesiny komórek S5 o gęstości optycznej 1,2 (OD<sub>600</sub>) w pożywce MSM (3,78 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>x12H<sub>2</sub>O, 0,5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 g NH<sub>4</sub>Cl, 0,2 g MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 0,01 g ekstraktu drożdżowego, woda destylowana do objętości 1 l) o pH 7,2; suplementowanej glukozą (0,5 g/L), NaCl (10 g/L) oraz MnSO<sub>4</sub> (0,01 g/L) i wytrząsanej przy prędkości 90 rpm przez 72 godziny w 30°C. W celu immobilizacji komórek szczepu B1(2015b) - 0,75 g gąbki Loofah inkubowane będzie w 100 ml zawiesiny komórek B1(2015b) o gęstości optycznej 0,2(OD<sub>600</sub>) w pożywce HCT o pH 8, suplementowanej glukozą (0,5 g/L) oraz MnSO<sub>4</sub> (1 g/L) i wytrząsanej przy prędkości 110 rpm przez 48 godzin w 20°C.

W celu immobilizacji komórek szczepu KB4 - 0,75 g gąbki Loofah inkubowane będzie w 100 ml zawiesiny komórek KB4 o gęstości optycznej 1,2 (OD<sub>600</sub>) w pożywce MSM o pH 8, wytrząsanej przy prędkości 130 rpm przez 24 godzin w 35°C.

W celu immobilizacji komórek szczepu KB2 - 0,75 g gąbki Loofah inkubowane będzie w 100 ml zawiesiny komórek KB2 o gęstości optycznej 1,2 (OD<sub>600</sub>) w pożywce MSM o pH 7,2, wytrząsanej przy prędkości 130 rpm przez 72 godzin w 30°C. W kolejnym kroku gąbki Loofah z immobilizowanymi komórkami badanych szczepów płukane były dwukrotnie 0,9% roztworem NaCl i wykorzystywane w dalszych badaniach. Badania w układach stacjonarnych prowadzone były w pożywce mineralnej MSM. W celu wyboru odpowiedniego składu preparatu do pożywki mineralnej suplementowanej 250 ul/l każdego z badanych leków (naproksen, paracetamol, diklofenak, ibuprofen) oraz 150 mg/l fenolu wprowadzone zostały preparaty odpowiednio o składzie (1) B1, KB4, KB2; (2) B1, KB4, S5; (3) B1, KB4, KB2, S5.

W celu określenia optymalnej ilości badanego preparatu do pożywki mineralnej suplementowanej fenolem w stężeniu 0,5 mg/l lub 300 mg/l oraz mieszaniną leków w sumarycznym stężeniu 0,1mg/l lub 0,5 mg/l wprowadzano zaproponowane trzy różne ilości badanego preparatu.

Hodowle prowadzone były przez 4 tygodnie lub do całkowitej degradacji związków, z wytrząsaniem 130 rpm z wykorzystaniem wytrząsarek Certomat.

**„Preparat stymulujący degradację niesteroidowych leków przeciwzapalnych w oparciu o immobilizowane na naturalnym nośniku szczepy bakterii”**

Umowa nr TANGO-IV-A/0049/2019-00

Stężenie leków oraz fenolu w hodowlach stacjonarnych i bioreaktorze oznaczane było co 24 godziny przy użyciu HPLC wyposażonego w kolumnę Ascentis® Express C18 (10 cm x 4,6 mm; 2,7  $\mu$ m) o odwróconym układzie faz, przedkolumnę OPTISOLV® EXP i detektor UV/VIS typu DAD. Faza ruchoma dla naproksenu, ibuprofenu i fenolu składała się z 1% kwasu octowego i acetonitrylu (50:50 v/v), przy przepływie wynoszącym 1 ml/min. Faza ruchoma dla paracetamolu składała się z 1% kwasu octowego i metanolu (95:5 v/v), przy przepływie wynoszącym 1 ml/min. Faza ruchoma dla diklofenaku składała się z acetonitrylu, 1% kwasu octowego i metanolu (50:30:20 v/v/v), przy przepływie wynoszącym 1 ml/min. Detekcję naproksenu i paracetamolu prowadzono przy długości fali  $\lambda$  = 260 nm, ibuprofenu przy długości fali  $\lambda$  = 230 nm, diklofenaku przy długości fali  $\lambda$  = 276 nm, a fenolu przy długości fali  $\lambda$  = 272 nm. Do oznaczenia związków pobierane były 1,5 ml próbki i odwirowywane (14000 rpm, 20 min) z wykorzystaniem wirówki typu Eppendorf. Badane związki w supernatancie, identyfikowane były na podstawie czasu retencji i widma UV/VIS roztworu wzorcowego. Aktywność metaboliczna preparatów oznaczana metodą z dioctanem fluoresceiny.

Badania w układzie bioreaktorowym prowadzone były w reaktorze zawierającym 1 l osadu czynnego z oczyszczalni ścieków Klimzowiec Chorzów- Świętochłowice, ścieki syntetyczne (160 mg peptonu, 110 mg ekstraktu mięsnego, 30 mg mocznika, 28 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 7 mg  $\text{NaCl}$ , 4 mg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 2 mg  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). Ścieki syntetyczne suplementowane były 250  $\mu\text{g/l}$  każdego z badanych leków oraz 150 mg/l fenolu. Hodowla prowadzona w warunkach ciągłego napowietrzania, w temperaturze 15 stopni Celsjusza. Obserwacja zmian struktury nośnika prowadzona z zastosowaniem oraz z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) wg Dzionek i in. (2018). Monitorowanie BZT oraz stężenia azotu amonowego oraz azotanów (III) i (V) prowadzone były zgodnie z Michalska et al. (2019). Badania przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Wyniki analizowano przy użyciu programu STATISTICA PL 13.1.



**KONTAKT:** [transfer@us.edu.pl](mailto:transfer@us.edu.pl)