

ЛЕКЦИЯ 11

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ФАРМПOLLЮТАНТОВ

- 1. Загрязнение окружающей среды фармацевтическими субстанциями**
- 2. Микроорганизмы – деструкторы фармпollютантов**

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДЕГРАДАЦИЯ ФАРМПОЛЛЮТАНТОВ

Фармполлютанты – высокостабильные соединения с разнообразной химической структурой и высокой биологической активностью

Обнаруживаются в почве, донных осадках водоемов, поверхностных, сточных, грунтовых водах, питьевой воде:

- 1965–1976 гг. – первое упоминание о присутствии лекарственных соединений в сточных водах;
- 1985 г. – возник вопрос о токсичности и биodeградability фармполлютантов;
- конец 1990-х гг. – присутствие фармполлютантов в природных экосистемах начали рассматривать как новую экологическую проблему

Опасность фармполлютантов обусловлена:

- мобильностью;
- низкой биодоступностью;
- высокой биологической активностью.

ЭФФЕКТЫ НАКОПЛЕНИЯ ФАРМПОЛЛЮТАНТОВ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ

Содержание многих фармполлютантов в окружающей среде *превышает* показатели *максимально допустимого остаточного уровня*. Большинство из них являются *чрезвычайно опасными* (1 класс) и *высокоопасными* (2 класс) для окружающей среды.

Аккумуляция фармполлютантов в экосистемах и их длительное воздействие на живые организмы может сопровождаться рядом **неблагоприятных эффектов**:

- развитием злокачественных опухолей и нарушением работы почек у млекопитающих;
- снижением репродуктивной активности у рыб;
- другими патологическими изменениями.

ИСТОЧНИКИ ФАРМПОЛЛЮТАНТОВ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ

Основные **причины попадания** фармполлютантов в природные экосистемы:

- массовое применение лекарственных средств в медицине и различных отраслях хозяйственной деятельности человека (ветеринария, животноводство, птицеводство, рыбоводство и др.);
- выбросы и отходы фармацевтических предприятий, образующиеся в результате интенсивного развития фарминдустрии.

На мировом рынке зарегистрировано около **4000 фармацевтических субстанций**.

Количество фармацевтических отходов в развитых странах мира составляет 3,2 кг/сутки, в России – до 5 кг/сутки, при этом их доля составляет 7% от общего количества отходов.

По данным американского агентства Associated press в США в 2008 г. было использовано около 15 млн кг антибиотиков.

Уровень экскреции фармполлютантов из организма человека составляет 30-90%.



ОСНОВНЫЕ ПУТИ ПОПАДАНИЯ ФАРМПОЛЛЮТАНТОВ В ОКРУЖАЮЩУЮ СРЕДУ

ИСТОЧНИКИ ФАРМПОЛЛЮТАНТОВ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ

Пути загрязнения окружающей среды лекарственными средствами:

- 1) сточными водами предприятий, использующих несовершенные методы очистки (озонирование, хлорирование, сорбирование углем и т.д.) от данных специфических ксенобиотиков;
- 2) сточными водами сельскохозяйственных предприятий, использующих лекарственные средства;
- 3) через бытовые канализационные стоки, в которых находятся экскременты людей, принимавших лекарства;
- 4) путем выщелачивания мест захоронения отходов,
- 5) в результате несовершенных способов утилизации фармацевтических отходов (сжигание, слив в промышленную канализацию, размещение на санитарных полигонах).

ИСТОЧНИКИ ФАРМПОЛЛЮТАНТОВ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ

При *сжигании* образуются токсичные продукты, во избежание загрязнения атмосферы которыми требуются специализированные термомодули, обеспечивающие температурный режим не ниже 110°C, что делает данный способ утилизации весьма дорогостоящим.

Слив в промышленную канализацию может использоваться только для препаратов, содержащих растворимые в воде лекарственные вещества, после стократного разбавления водой (*рекомендуемая степень разбавления не всегда учитывает предельно допустимую концентрацию в воде*).

Использование *хлорирования* для нейтрализации фармполлютантов способствует образованию еще более токсичных продуктов, чем исходное соединение.

Озонирование является дорогостоящим методом очистки. Использование озона придает воде специфический запах и приводит к коррозии труб.

Ультразвуковая обработка требует дорогостоящего оборудования и высоких энергетических затрат.

Перспективным является поиск альтернативных технологий, направленных на нейтрализацию фармацевтических соединений.

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ФАРМПОЛЛЮТАНТОВ В ЭКОСИСТЕМАХ

При анализе природных водных образцов, полученных в 22 странах мира, найдено **178** наименований **лекарственных препаратов и их метаболитов**.

Основные фармполлютанты по терапевтическому воздействию представлены:

- **противомикробными препаратами** широкого спектра действия (линкомицин, офлоксацин сульфаметоксазол, др.);
- **противоэпилептическими и психотропными препаратами** (диазепам, карбамазепин, оксазепам, др.);
- **препаратами анальгезирующего действия** (дротаверина гидрохлорид, папаверина гидрохлорид, кодеин и др.).

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ФАРМПОЛЛЮТАНТОВ В ЭКОСИСТЕМАХ

Противомикробные препараты:

Сульфаметоксазол (группа сульфамидов) в различной концентрации детектирован в образцах речных вод, отобранных из нескольких стран мира – Швеции (20–70 нг/л), Кении (10000–30000 нг/л), а также пробах морской воды из Китая (Желтое море) (8,3 нг/л), сточных водах больничных учреждений США (2000 нг/л). В сточных водах Южной Кореи выявлено присутствие как самого сульфаметоксазола (7,4–8092 нг/л), так и его метаболита N-ацетил-сульфаметоксазола. При этом концентрация исходного препарата на порядок превышала содержание продукта разложения

Сульфаметоксазол в микроколичествах представляет различные уровни экологического риска для цианобактерий *Synechococcus leopoliensis* и микроводорослей *Pseudokirchneriella subcapitata*, а в относительно высоких (300 мг/л) концентрациях оказывает ингибирующее воздействие в отношении высших растений – гороха *Pisum sativum* L., кукурузы *Zea mays* L., проса *Panicum miliaceum* L., ячменя *Hordeum vulgare* L., подавляя развитие их корневой системы, стебля и листьев.

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ФАРМПОЛЛЮТАНТОВ В ЭКОСИСТЕМАХ

Противомикробные препараты:

Цефалексин (антибиотик группы цефалоспоринов) обнаружен в образцах сточных вод о. Тайвань (1536-28889 нг/л).

Линкомицин (антибиотик группы линкозамидов) выявлен в речных водах Италии (3,13-248.90 нг/л).

Данный антибиотик вызывает снижение репродуктивной активности веслоногих рачков *Daphnia magna*, способен ингибировать нитрифицирующую активность микроорганизмов, входящих в состав активного ила.

Офлоксацин, норфлоксацин, ципрофлоксацин (антибиотики группы фторхинолонов) обнаружены в образцах сточных вод Италии, осадке сточных вод Эстонии и США (0,12 – 426 мкг/кг).

Цианобактерии *Microcystis aeruginosa* чувствительны к данным соединениям в концентрации 1 мкг/л. Среди растений наиболее чувствительны ряска *Lemna minor* (токсическая концентрация 53-2470 мкг/л) и микроводоросли *Pseudokirchneriella subcapitata* (1100-22700 мкг/л). В отношении беспозвоночных организмов (рачков *Daphnia magna*) и позвоночных (рыб *Pimephales promelas*) токсичная концентрация антибиотиков превышала значения 10 мг/л.

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ФАРМПОЛЛЮТАНТОВ В ЭКОСИСТЕМАХ

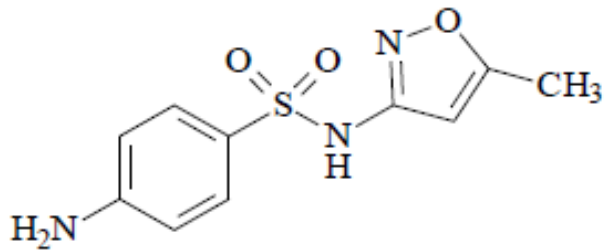
Противомикробные препараты:

Токсическое воздействие антибиотиков группы нитроимидазола (**метронидазол**) и хинолинов (**хлорохин**) изучено в отношении соевых бобов *Glycine max* L. Последствием токсических эффектов является увядание или гибель отдельных растений.

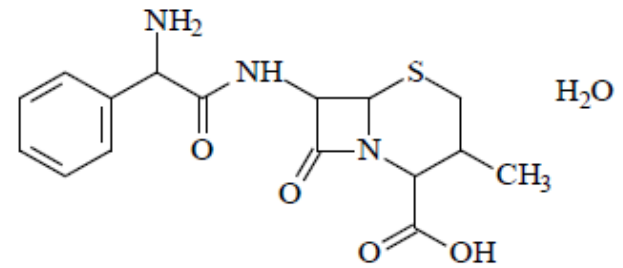
Антибактериальные препараты разнообразной химической структуры детектированы в концентрации 2-17 нг/г в ряде сельскохозяйственных культур – кукурузе *Zea mays* L., капусте *Brassica oleracea* L., зеленом луке *Allium cepa* L.

Существует корреляция частоты использования того или иного антибиотика в различных отраслях хозяйственной деятельности человека от его концентрации, детектированной в овощах.

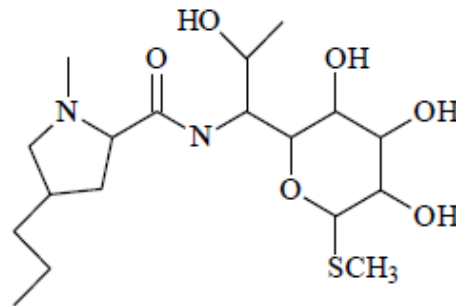
Остро стоит **проблема изменения генетического пула микроорганизмов** под действием антибиотических веществ и развития антибиотикорезистентности. Резистентность микроорганизмов к данным соединениям не только затрудняет борьбу с инфекциями, но и приводит к нарушению биоразнообразия в экосистемах.



Структурная формула
сульфаметоксаз



Структурная формула
эфалексина



Структурная формула
линкомицина

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ФАРМПОЛЛЮТАНТОВ В ЭКОСИСТЕМАХ

Препараты противэпилептического и психотропного действия:

Диазепам, оксазепам, примидон, карбамазепин детектированы в поверхностных и сточных водах муниципальных очистных сооружений Германии, Италии, Румынии и Японии.

Концентрации одного и того же вещества в разных странах существенно различались. Концентрация карбамазепина в водных образцах из Германии составляла 1075 нг/л, а в водах Японии не превышала 270 нг/л.

Среди основных причин, обуславливающих частоту встречаемости и разный уровень обнаружения фармполлютантов в окружающей среде можно выделить особенности производства лекарственных средств, их маркетинг, употребление, а также устройство очистных сооружений, направленных на нейтрализацию токсического действия данных соединений.

Препараты психотропного действия приводят к нарушениям регенерации полипов гидры *Hudra vulgaris* (концентрация вещества, вызывающего токсический эффект, не превышает 10 мкг/л).

Диазепам детектируется в печени рыб (23-110 нг/г), что свидетельствует о потенциальной опасности диазепама для животных и человека, которые подвергаются его нетерапевтическому воздействию в результате потребления рыбы и прочих организмов, в тканях которых данное соединение аккумулируется

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ФАРМПОЛЛЮТАНТОВ В ЭКОСИСТЕМАХ

Препараты анальгезирующего действия:

Присутствие в природной окружающей среде препаратов анальгезирующего действия регистрируется практически повсеместно. Для стран Западной Европы (Германии, Греции, Швеции), Северной Америки (США, Канады), некоторых азиатских стран (Южная Корея, Япония) большинство анальгезирующих препаратов, детектируемых в экосистемах, являются производными пропионовой и фенилуксусной кислот.

В России и некоторых странах Восточной Европы среди наиболее часто назначаемых и используемых анальгезирующих препаратов являются соединения, представляющие собой по химической структуре производные изохинолинового ряда. Это фармацевтические препараты, действующими веществами которых являются дротаверина гидрохлорид, папаверина гидрохлорид и кодеин.

Соединения изохинолиновой и хинолиновой структуры обладают канцерогенным эффектом и способствуют ранней смертности млекопитающих из-за разрыва сосудов и пролиферации желчных протоков.

Сведения о судьбе фармпрепаратов данной группы в окружающей среде малочисленны. Так, дротаверина гидрохлорид имеет эмбриотоксическое и нейротоксическое воздействие на млекопитающих; папаверин как алкалоид способен вызвать острое отравление и провоцировать нарушение кровообращения. Также выявлено токсичное воздействие папаверина гидрохлорида в отношении клеток печени крыс

Гетероциклические азотсодержащие фармацевтические препараты, детектируемые в экосистемах

Фармпрепарат	Страна	Источник обнаружения	ФП, мг/л	Литературный источник
Фармацевтические препараты антимикробного спектра действия				
Линкомицин	Италия	Речные воды	3.13 – 248.90	Strategic ..., 2003
Офлоксацин	Италия	Сточные воды	600.0	Pharmaceuticals ..., 2006
	США	Осадок сточных вод	0.3*	Presence ..., 2010
	Эстония	Осадок сточных вод	38.0*	Presence ..., 2010
Норфлоксацин	США	Осадок сточных вод	0.12*	Presence ..., 2010
	Эстония	Осадок сточных вод	162.0*	Presence ..., 2010
Сульфадимидин	Китай	Морские воды	0.01 – 0.16	Antibiotics ..., 2013
Сульфаметазин	Китай	Сточные воды	0.5 – 22.0	Fate ..., 2010
Сульфаметоксазол	Кения	Речные воды	100000 – 300000	From multi ..., 2012
	Китай	Морские воды	1.0 – 8.3	Antibiotics ..., 2013
	Китай	Сточные воды	405.0 – 1760.0	Fate ..., 2010
	Южная Корея	Сточные воды	7.4 – 8092.9	Removal ..., 2013
	США	Сточные воды	2000.0	Gorsalitz, 2012
	США	Грунтовые воды	170.0	Bennet, Fram, Belitz, 2014
	США	Питьевая вода	8.1 – 44.0	Snyder, Benotti, 2010
	Швеция	Речные воды	20.0 – 70.0	Occurrence ..., 2005
Триметоприм	Китай	Морские воды	1.4 – 16.6	Antibiotics ..., 2013
	США	Сточные воды	700.0	Gorsalitz, 2012
Цефалексин	Китай	Сточные воды	1536.0 – 28889.0	Fate ..., 2010
Ципрофлоксацин	Эстония	Осадок сточных вод	426.0*	Presence ..., 2010
Фармацевтические препараты анальгезирующего спектра действия				
Кодein	США	Грунтовые воды	214.0	Bennet, Fram, Belitz, 2014
Фармацевтические препараты, применяемые при расстройствах желудка				
Омепразол	Испания	Морская вода	14.0 – 18.0	Pollution ..., 2013
Фармацевтические препараты противовирусного спектра действия				
Зидовудин	Кения	Речные воды	10000 – 30000	From multi ..., 2012
Фармацевтические препараты, применяемые при расстройствах сна				
Зопиклон	Испания	Речные воды	19.0	Pollution ..., 2013
Оксазепам	Испания	Речные воды	8.58 – 1.365	Pollution ..., 2013
Фармацевтические препараты противоспазмолитического и психостимулирующего действия				
Диазепам	Испания	Речные воды	19.0	Pollution ..., 2013
Карбамазепин	Южная Корея	Сточные воды	108.3 – 2085.4	Removal ..., 2013
	США	Питьевая вода	2.8 – 39.0	Snyder, Benotti, 2010
	США	Грунтовые воды	420.0	Bennet, Fram, Belitz, 2014
	Испания	Речные воды	19.0 – 249.0	Pollution ..., 2013
	Германия	Речные воды	25.0 – 1075.0	Heberer, 2002
	Япония	Сточные воды	15.0 – 270.0	Pharmaceutical chemicals ..., 2006
	Румыния	Сточные воды	192.8 – 774.1	Pharmaceutical and personal ..., 2008
Кофеин	США	Сточные воды	1000000	Gorsalitz, 2012
	США	Питьевая вода	14.0 – 87.0	Snyder, Benotti, 2010
	Китай	Сточные воды	5173.0 – 23345.0	Fate ..., 2010

Примечание. * - приведены данные в мг/кг. Лекарственные средства антимикробного спектра действия.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ДЕСТРУКЦИЯ ФАРМПОЛЛЮТАНТОВ

Поступившие различными путями в окружающую среду лекарственные средства подвергаются процессу *биологической деструкции микроорганизмами*, присутствующими в почвенных и водных микробиоценозах. Однако данный процесс обычно происходит медленно, с возможным образованием токсичных продуктов, например, производных фенола, которые могут поступать в источники водоснабжения.

При воспроизведении процесса биологической деструкции в лабораторных и промышленных условиях производится его интенсификация путем:

- 1) использования искусственно выделенных из природных сред (почвы, природных вод) активных штаммов-биодеструкторов;
- 2) иммобилизации бактериальных клеток на специальных носителях (модифицированном древесном опиле, криогеле поливинилового спирта и др.);
- 3) адаптации ферментного комплекса бактерий к определенному лекарственному веществу или его структурному аналогу;
- 4) использования соокислителей и др.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ДЕСТРУКЦИЯ ФАРМПОЛЛЮТАНТОВ

Фармполлютанты антимикробного спектра действия характеризуются низкой биodeградaбельностью в экосистемах. Период полураспада молекулы метронидазола в поверхностных водах составлял от 14 до 104 сут., в почве – от 13.1 до 26.9 сут. Уровень биологической деструкции офлоксацина, сульфаметоксазола, триметоприма с помощью активного ила составил 0,5–18% через 4 сут.

Фармацевтические соединения *противоэпилептического и психостимулирующего действия* также имеют высокую стабильность химической структуры молекулы. Убыль диазепама и оксазепама при использовании активного ила через 60 сут. Не превышала 10 и 80%, соответственно. При этом среди продуктов биодеструкции выявлялись соединения 1,4-бензодиазепин, 2-енол или 3-енол нордиазепам, труднодоступные для микроорганизмов. Эффективная биодеструкция карбамазепина (до 94% через 6 сут.) возможна с использованием грибов *Trametes versicolor* с образованием таких соединений как акридон, акридин, 10,11-дигидро10,11-дигидроксикарбамазепин и 10,11-эпоксикарбамазепин.

В то же время есть данные, свидетельствующие о том, что использование базидиомицетных грибов обеспечивало только 42%-ную эффективность биодеструкции карбамазепина в присутствии глюкозы через 28 сут.

Биодеструкция карбамазепина бактериальными клетками *Pseudomonas* sp. составляла 46.6% через 6 сут.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ДЕСТРУКЦИЯ ФАРМПОЛЛЮТАНТОВ

Биодеструкция азотсодержащих гетероциклических *фармполлютантов* *анальгезирующего спектра действия*, имеющих в составе молекулы изохинолиновый цикл, изучена незначительно. В этом отношении наиболее исследованным фармацевтическим соединением является кодеин. Установлена возможность биотрансформации кодеина клетками *Pseudomonas putida*. Однако его биоразложение протекало с образованием еще более токсичных для окружающей среды продуктов ацетилкодеина, оксикодона, норкодеина и морфина.

Аналогичная ситуация описана при биодеструкции кодеина с использованием бактерий родов *Bacillus* и *Streptomyces*. Среди продуктов биодеструкции идентифицированы 14-гидроксикодеинон и 14-гидроксикодеин.

Биодеструкцию папаверина в качестве единственного источника углерода и энергии проводили с использованием бактерий рода *Nocardia*, грибов родов *Aspergillus* и *Cunninghamella*. Использование грибов рода *Phanerochaete* позволило в течение 4 сут. полностью деструктировать папаверина гидрохлорид в присутствии в среде дополнительного источника азота. Продукты биодеструкции папаверина с использованием клеток *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 34541 не описаны.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ДЕСТРУКЦИЯ ФАРМПОЛЛЮТАНТОВ

Полное расщепление молекулы дротаверина гидрохлорида возможно с использованием в качестве деструкторов актинобактерий рода *Rhodococcus*, при этом конечными продуктами биологического распада являются менее токсичные соединения – производные протокатеховой кислоты.

Использование различных приемов стимулирования деградирующей активности родококков: прединкубация клеток в присутствии низких концентраций поллютанта, введение в инкубационную среду дополнительных энергетических субстратов, иммобилизация клеток на твердых носителях, обеспечивали полную биодеструкцию ДГ на 30 сут. ферментации.

Исследование процесса биологической деструкции лекарственных средств перспективно не только с целью получения новых данных о разложении фармполлютантов в природных условиях, поиска новых технологий утилизации непригодных для медицинского использования лекарственных средств, но и **получения на их основе новых биологически активных соединений**, а также продуктов с иными полезными свойствами.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ДЕСТРУКЦИЯ ФАРМПОЛЛЮТАНТОВ

Полное расщепление молекулы дротаверина гидрохлорида возможно с использованием в качестве деструкторов актинобактерий рода *Rhodococcus*, при этом конечными продуктами биологического распада являются менее токсичные соединения – производные протокатеховой кислоты.

Использование различных приемов стимулирования деградирующей активности родококков: прединкубация клеток в присутствии низких концентраций поллютанта, введение в инкубационную среду дополнительных энергетических субстратов, иммобилизация клеток на твердых носителях, обеспечивали полную биодеструкцию ДГ на 30 сут. ферментации.

Исследование процесса биологической деструкции лекарственных средств перспективно не только с целью получения новых данных о разложении фармполлютантов в природных условиях, поиска новых технологий утилизации непригодных для медицинского использования лекарственных средств, но и **получения на их основе новых биологически активных соединений**, а также продуктов с иными полезными свойствами.

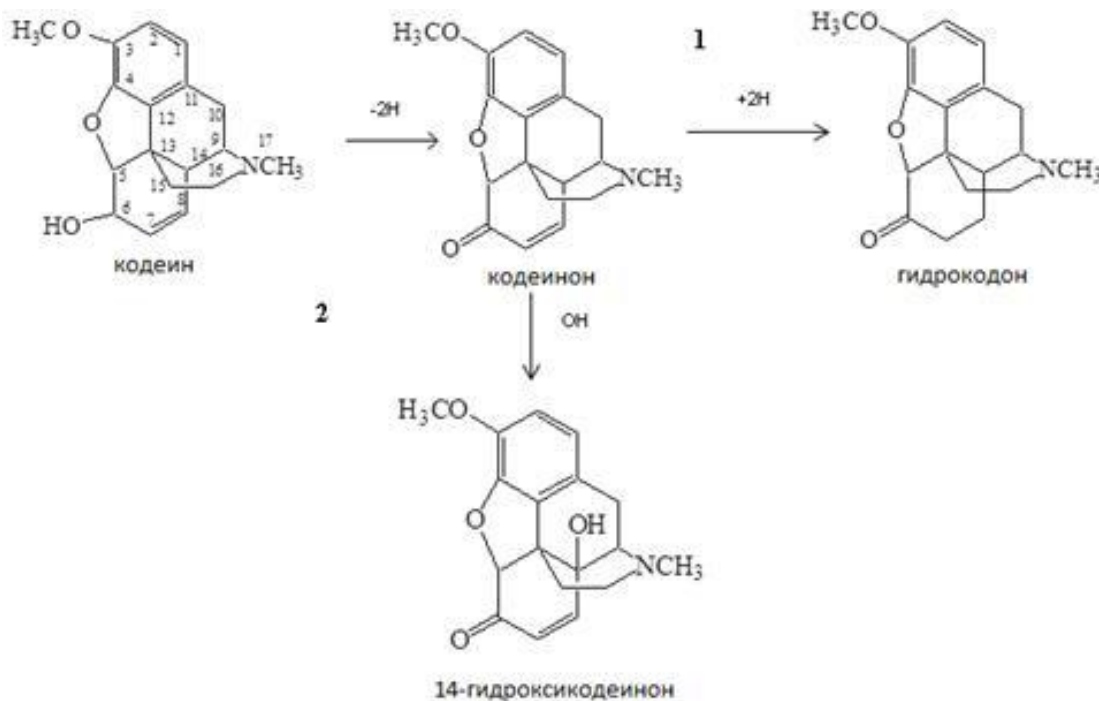
БИОЛОГИЧЕСКАЯ ДЕСТРУКЦИЯ ФАРМПОЛЛЮТАНТОВ

В процессе биологической деструкции **дротаверина гидрохлорида** актинобактериями рода *Rhodococcus* выявлена предполагаемая структура 1-оксо-6,7-диэтокси-1,2,3,4-тетрагидроизохинолина - наиболее вероятный структурный аналог производных изокарбостирола, обладающего разнообразными видами биологической активности, в том числе противоопухолевой.

Продукты биологической деструкции **парацетамола** актинобактериями рода *Rhodococcus*, содержащие вещества фенольной природы, оказывают ростостимулирующее действие на однодольные и двудольные сельскохозяйственные растения овес посевной (*Avena sativa* L.) и горох посевной (*Pisum sativum*), на лекарственное растение – мяту перечную, увеличивая сухую биомассу листьев на 4,56% и содержание эфирного масла в них на 15,6 % по сравнению с контролем.

Продукты биологической деструкции салицилата натрия актинобактериями рода *Rhodococcus* оказывают стимулирующее действие на энергию прорастания семян растений, увеличивая длину корней проростков овса посевного, фасоли обыкновенной и календулы лекарственной по сравнению с контролем на 46,3, 54,5 и 105,3%, соответственно.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ДЕСТРУКЦИЯ ФАРМПОЛЛЮТАНТОВ



Трансформация молекулы кодеина бактериями *R. rhodochrous* может протекать по двум направлениям:

1 – в результате реакции дегидрирования кодеина в 6 положении образуется кодеинон, который восстанавливается в положениях 7-8 до гидрокодона;

2 – превращение кодеина в кодеинон в результате реакции дегидрирования в 6 положении с последующим превращением кодеинона в 14-гидрокси Кодеинон в результате реакции гидроксирования в 14 положении.

Образующийся в процессе биодеструкции **14-гидрокси Кодеинон** является важным промежуточным веществом в синтезе 14-гидроксинорморфинов, широко используемых наркотических анальгетических средств, а также антагонистов опиатных рецепторов – оксикодона, нороксиморфона, налтрексона и др.