



Zachodniopomorski
Uniwersytet
Technologiczny
w Szczecinie



Wydział
Kształtowania
Środowiska i Rolnictwa

Szczecin, 24.02.2025.....

„Wykorzystanie aktywności fosfataz w ocenie oddziaływania wybranych niesteroidowych leków przeciwzapalnych na środowisko glebowe”

Streszczenie

Niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ), ze względu na powszechność stosowania stanowią potencjalne ryzyko ekotoksykologiczne. Ponieważ większość tych związków nie jest w pełni usuwana ze ścieków, dostają się one do środowiska. Konieczne jest zatem prowadzenie badań nad zachowaniem się tych substancji w środowisku. Niestety aktualnie najwięcej badań dotyczy środowiska wodnego, z niewielkim uwzględnieniem gleby.

Zawartość w glebie przyswajalnych form fosforu jest jednym z czynników limitujących wzrost i rozwój roślin. Większość fosforu występuje w glebie w połączeniach organicznych, które nie są dostępne dla roślin. Hydroliza organicznych połączeń fosforu katalizowana jest przez fosfatazy.

Dlatego też celem podjętych badań była ocena oddziaływania wybranych niesteroidowych leków przeciwzapalnych: ibuprofenu, flurbiprofenu, ketoprofenu, naproksenu i diklofenaku na aktywność fosfataz glebowych: fosfomonoesterazy zasadowej [EC 3.1.3.1], fosfomonoesterazy kwaśnej [EC 3.1.3.2], fosfotriesteraz [EC 3.1.5] oraz pirofosfatazy nieorganicznej [EC 3.6.1.1].

Badania przeprowadzono w dwóch etapach: jako doświadczenie laboratoryjne (ocena długotrwałego oddziaływania NLPZ) oraz jako doświadczenie wazonowe (ocena krótkotrwałego oddziaływania NLPZ). Oba doświadczenia przeprowadzono na próbkach gleby pobranych z poziomu orno-próchnicznego gleb rdzawych Rolniczej Stacji Doświadczalnej Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Był to piasek gliniasty o zawartości węgla organicznego 8,71 g·kg⁻¹.

W doświadczeniu laboratoryjnym do części ziemistych materiału glebowego wprowadzono wszystkie analizowane związki w dawkach: 0(kontrola), 1, 10 i 100 mg·kg⁻¹ s.m. gleby. Wilgotność próbek gleby doprowadzono do 60% maksymalnej pojemności wodnej i przechowywano w szczelnie zamkniętych workach poliestrowych w ciemności w temperaturze 20°C. W kolejnych terminach pomiarów, czyli: 1., 30., 60., 90. oraz 120. dniu w próbkach oznaczono aktywność wszystkich fosfataz.

W doświadczeniu wazonowym zastosowano takie same dawki NLPZ, jak w doświadczeniu laboratoryjnym. Jednak w tym etapie badań oceniano wpływ ibuprofenu, naproksenu i diklofenaku wprowadzonych do gleby oddzielnie i w mieszaninach, na aktywność fosfomonoesterazy zasadowej, fosfomonoesterazy kwaśnej i pirofosfatazy nieorganicznej. W przypadku mieszanin leków stosunek masy poszczególnych związków wynosił 1:1. Wilgotność gleby doprowadzono do 60% maksymalnej pojemności wodnej. Tak przygotowanymi próbkami gleby napełniano doniczki, do których wysiano po 20 7

identycznych ziarniaków jęczmienia zwyczajnego odmiany 'Suweryn' (*Hordeum vulgare* L. cv. Suweryn). Przez cały okres doświadczenia utrzymywano stałą wilgotność gleby oraz stałą temperaturę $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Odpowiednio w 1., 7., 14. i 21. dniu doświadczenia pobierano próbki glebowe i oznaczano w nich aktywność wymienionych wcześniej enzymów.

Na podstawie wyników badań obliczono wskaźniki oporności oznaczanych enzymów. Otrzymane wyniki opracowano statystycznie wykorzystując analizę wariancji jednoczynnikową, a także analizę η^2 oraz analizę skupień z aglomeracją Warda i odległością euklidesową.

Na podstawie przeprowadzonych badań, stwierdzono, że najczęściej obserwowanym efektem oddziaływania NLPZ była inhibicja aktywności fosfataz glebowych. Wprowadzenie do gleby NLPZ w dawce $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ gleby bardzo często nie wpływało istotnie na lub spowodowało niewielkie podwyższenie aktywności fosfataz. Natomiast dla dawek 10 oraz $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ gleby najczęściej wykazane obniżenie aktywności fosfataz glebowych zwiększało się wraz ze wzrostem dawki NLPZ. Najbardziej wrażliwymi fosfatazami glebowymi na obecność NLPZ, zarówno w doświadczeniu laboratoryjnym, jak i wazonowym okazały się fosfomonoesteraza zasadowa oraz pirofosfataza nieorganiczna. Trudno jednoznacznie wskazać, który z badanych związków w największym stopniu oddziaływał na aktywność fosfataz glebowych. Można jednak stwierdzić, że w wielu przypadkach największy wpływ na aktywność fosfatazową gleby stwierdzono dla diklofenaku, a najmniejszy dla ibuprofenu. Współczynniki oporności fosfataz glebowych w bardzo dobry sposób zobrazowały zaburzenia w homeostazie gleby pod wpływem NLPZ. Stwierdzone dysfunkcje w metabolizmie związków fosforowych pogłębiały się wraz ze wzrostem dawki leku. Przeprowadzona analiza η^2 wykazała, że czynnikiem doświadczalnym, w największym stopniu wpływającym na aktywność fosfataz glebowych, zarówno w badaniach laboratoryjnych, a także wazonowych, była dawka niesteroidowych leków przeciwzapalnych. W ocenie krótkotrwałego wpływu NLPZ: ibuprofenu, naproksenu i diklofenaku oraz ich mieszanin, trudno jednoznacznie określić czy wystąpiły synergistyczne, czy antagonistyczne interakcje w oddziaływaniu tych związków na aktywność fosfataz w glebie.

Porównując otrzymane wyniki z danymi literaturowymi należy stwierdzić, że konieczna jest dalsza analiza oddziaływania NLPZ na metabolizm związków fosforowych w glebie, uwzględniająca również możliwości ograniczenia działania tych związków na środowisko glebowe. 8

Słowa kluczowe: fosfomonoesterazy, fosfotriesterazy, gleba, niesteroidowe leki przeciwzapalne, pirofosfataza nieorganiczna, współczynniki oporności

Barzak Donata



Zachodniopomorski
Uniwersytet
Technologiczny
w Szczecinie



Wydział
Kształtowania
Środowiska i Rolnictwa

Szczecin, *24.02.2025*

„Use of phosphatase activity in assessing the effect of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs on the soil environment”

Summary

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), due to their widespread use, pose a potential ecotoxicological risk. Since most of these compounds are not fully removed from sewage, they enter the environment. It is therefore necessary to conduct research on the behavior of these substances in the environment. Unfortunately, most research currently concerns the aquatic environment, with little consideration of soil.

The content of available forms of phosphorus in the soil is one of the factors limiting the growth and development of plants. Most phosphorus occurs in the soil in organic compounds that are not available to plants. The hydrolysis of organic phosphorus compounds is catalyzed by phosphatases.

Therefore, the aim of the study was to assess the effect of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs: ibuprofen, flurbiprofen, ketoprofen, naproxen and diclofenac on the activity of soil phosphatases: alkaline phosphomonoesterase [EC 3.1.3.1], acid phosphomonoesterase [EC 3.1.3.2], phosphotriesterase [EC 3.1.5] and inorganic pyrophosphatase [EC 3.6.1.1].

The study was conducted in two stages: as a laboratory experiment (assessment of the long-term effect of NSAIDs) and as a pot experiment (assessment of the short-term effect of NSAIDs). Both experiments were carried out on soil samples from the arable-humus horizon

of rusty soils of the Agricultural Experimental Station of the West Pomeranian University of Technology in Szczecin. It was loamy sand with an organic carbon content of 8.71 g·kg⁻¹. In the laboratory experiment, all the analyzed compounds were added into the soil material at doses of: 0 (control), 1, 10 and 100 mg·kg⁻¹ d.m. of soil. The moisture content of the soil samples was adjusted to 60% of the maximum water capacity and stored in tightly closed polyester bags in the dark at 20°C. At the subsequent measurement dates, i.e.: 1, 30, 60, 90 and 120 days, the activity of all phosphatases was determined in the samples.

In the pot experiment, the same doses of NSAIDs were used as in the laboratory experiment. However, at this stage of the study, the effect of ibuprofen, naproxen and diclofenac applied into the soil separately and in mixtures on the activity of alkaline phosphomonoesterase, acid phosphomonoesterase and inorganic pyrophosphatase was assessed. In the case of drug mixtures, the mass ratio of the individual compounds was 1:1. Soil moisture was adjusted to 60% of the maximum water capacity. Pots were filled with soil samples prepared in this way, and then 20 identical grains of common barley cultivar 'Suweren' (*Hordeum vulgare* L. cv. Suweren) were sown into each pot. Constant soil moisture and temperature of 20±2°C were maintained throughout the experiment. Soil samples were taken on the days: 1, 7, 14 and 21, respectively, and the activity of the previously mentioned enzymes was determined.

Based on the results of the studies, resistance indices of the determined enzymes were calculated. The obtained results were statistically processed using single-factor variance analysis, as well as η^2 analysis and cluster analysis with Ward agglomeration and Euclidean distance.

Based on the conducted studies, it was found that the most frequently observed effect of NSAIDs was the inhibition of soil phosphatase activity. Introduction of NSAIDs to the soil at a dose of 1 mg·kg⁻¹ d.m. soil very often did not significantly affect or caused a slight increase in the activity of phosphatases. On the other hand, for doses of 10 and 100 mg kg⁻¹ d.m. of soil, the most frequently observed decrease in the activity of soil phosphatases increased with the increase in the dose of NSAIDs. The most sensitive soil phosphatases to the presence of NSAIDs, both in the laboratory and pot experiments, were alkaline phosphomonoesterase and inorganic pyrophosphatase. It is difficult to clearly indicate which of the tested compounds had the greatest effect on the activity of soil phosphatases. However, it can be stated that in many cases the greatest effect on the phosphatase activity of soil was found for diclofenac, and the smallest for ibuprofen. The resistance coefficients of soil phosphatases very well demonstrated disturbances in soil homeostasis under the influence of NSAIDs. The observed dysfunctions in

the metabolism of phosphorus compounds deepened with the increase in the dose of the drug. The η^2 analysis showed that the experimental factor that had the greatest impact on the activity of soil phosphatases, both in laboratory and pot studies, was the dose of non-steroidal anti-inflammatory drugs. In the assessment of the short-term effect of NSAIDs: ibuprofen, naproxen and diclofenac and their mixtures, it is difficult to clearly determine whether synergistic or antagonistic interactions occurred in the effect of these compounds on the activity of phosphatases in soil.

Comparing the obtained results with literature data, it should be stated that further analysis of the effect of NSAIDs on the metabolism of phosphorus compounds in the soil is necessary, also taking into account the possibilities of limiting the effect of these compounds on the soil environment.

Key words: phosphomonoesterase, phosphotriesterase, soil, Non-steroidal anti-inflammatory drugs, inorganic pyrophosphatase, resistance indices

Barzok Donote