



Invloed fermentatie op medicijnconcentratie in urine

In opdracht van Anthroponix en
Wetenschapswinkel



Titel: Invloed fermentatie op medicijnconcentratie in urine

Status: Eindrapport
Datum: 12-3-2020

Opdrachtgever: Anthroponix en Wetenschapswinkel
Thieu Custers, thieucusters@live.nl (Anthroponix)
Eva van Strien, e.vstrien@hotmail.com (Anthroponix)
Marcel Vijn, marcel.vijn@wur.nl (Wetenschapswinkel)

Auteurs: Els Schuman, Jan Weijma

LeAF projectnummer: 19358

Aantal pagina's: 8

LeAF B.V.
Postbus 500
6700 AM Wageningen
0317 484208
info@leaf-wageningen.nl
<http://www.leaf-wageningen.nl>

1. Inleiding

Anthroponix heeft een concept ontwikkeld waarbij de COD (~10 g/L) in urine wordt gefermenteerd om het vervolgens toe te kunnen passen als meststof voor planten. In een eerder uitgevoerd onderzoek is gekeken naar het effect van de fermentatie met melkzuurbacteriën op verschillende parameters, inclusief medicijnresten aanwezig in urine. De resultaten van de geneesmiddelenanalyse waren niet eenduidig. Voor sommige medicijnresten was er namelijk een toename in concentratie waargenomen. Mogelijk houdt dit verband met het feit dat een deel van de medicijnen via de urine kan worden uitgescheiden in conjugaatvorm (stofafhankelijk). Dergelijke conjugaten kunnen door microbiologische processen naar hun oorspronkelijke (medicijn)vorm worden omgezet. Dit maakt het lastig om te bepalen of de medicijnen ook worden afgebroken tijdens fermentatie. In de hier beschreven test is de testopzet aangepast, en gewerkt met schone urine (vrij van medicijnresten) waaraan medicijnen zijn toegevoegd. De vraag die met deze test kan worden beantwoord is of tijdens fermentatie met melkzuurbacteriën de medicijnconcentratie in urine kan worden verlaagd. Deze rapportage beschrijft de testresultaten.

2. Materialen en Methode

2.1 Materialen

Urine

De urine die is gebruikt in de testen is verzameld door de opdrachtgever. Er is urine verzameld waarin geen medicijnresten aanwezig zouden moeten zijn. Het is bevroren in flesjes aangeleverd bij LeAF, en in de vriezer bewaard tot gebruik in de testen (3 dagen later). Vlak voor aanvang van de test is de urine ontdooid en zijn de verschillende flesjes urine gemengd. De pH van de ontdooidde urine was 6.2.

Medicijnen

De medicijnvrije urine is gespiked met een viertal geneesmiddelen:

- Ibuprofen (pijnstiller, goed afbreekbaar in RWZI's)
- Naproxen (pijnstiller, matig afbreekbaar in RWZI's)
- Diclofenac (pijnstiller, een moeilijk afbreekbare stof in RWZI's)
- Carbamazepine (anti-epileptisch, zeer slecht afbreekbaar in RWZI's)

Deze selectie is gemaakt op basis van de stoffen die in eerder onderzoek zijn meegenomen, de beschikbaarheid ervan in ons laboratorium, de beschikbare analysepakketten en het verschil in verwijderingsrendement van deze stoffen op een rioolwaterzuiveringsinstallatie (RWZI). Eerst zijn de medicijnen opgelost in ultrapuur water. Vanuit deze geconcentreerde stockoplossing is vervolgens gespiket aan de urine.

Lactic acid bacteria (LAB)

De LAB-oplossing is gemaakt door melasse, zuurkoolsap en kraanwater te mengen in een verhouding van 1:1:8 (op basis van natgewicht). Dit is volgens het protocol van Anthroponix. Vervolgens is dit mengsel een week weggezet bij

20°C. Tijdens deze week is gezien dat er veel gasontwikkeling was, vooral als de fles even geschud werd kwamen er veel fijne belletjes vrij. De pH was over de week afgenomen van 4.5 naar 3.9.

2.2 Opzet test

De testen zijn uitgevoerd met 1L-Schott flessen. In totaal zijn er 4 flessen weggezet. In tabel 2-1 is een samenvatting van de testopzet gegeven.

Er zijn twee testflessen met urine, medicijnen en LAB weggezet. In een massaverhouding van 12:6:1 urine:LAB:stockoplossing met medicijnen. Er is een mengsel gemaakt genoeg om de 2 flessen met 800g vloeistof te kunnen vullen en om extra analyses te kunnen doen, waaronder analyse aan microverontreinigingen.

In fles 3 is in plaats van LAB kraanwater toegevoegd.. Deze controlefles is meegenomen om eventuele afbraak van medicijnen die niet toe te schrijven is aan de LAB te kunnen vast stellen.

In fles 4 is wel LAB gebruikt, maar is deze voor gebruik in de testen afgedood door het tweemaal te autoclavieren bij 120°C/30 minuten met tenminste 1 dag er tussen. Van dit afgedode LAB is 300 g gebruikt, en daarnaast 600g urine (met membraanfilter gefiltreerd om te voorkomen dat bacteriën op deze manier in de fles terecht komen) en 50g stockoplossing met medicijnen, dus in dezelfde verhouding als fles 1 en 2. Deze controlefles is meegenomen om eventuele sortie van medicijnen aan het LAB te kunnen vaststellen.

Van elke fles is op t=0 een monster genomen voor analyse van CZV, VFA, lactaat en pH. Daarnaast is van het mengsel in fles 1 en 2, ook één monster opgestuurd voor analyse aan microverontreinigingen.

Ook de stockoplossing met medicijnen is geanalyseerd op microverontreinigingen.

De flessen zijn geschud weggezet bij 20°C (100 rpm), gewikkeld in aluminiumfolie. Na 6 weken zijn de flessen van de schudbak gehaald en is de eindanalyse gedaan. Monsters zijn genomen voor microverontreinigingen, CZV, VFA, lactaat en pH analyse.

Tabel 2-1 Samenvatting opzet test.

	Test A (fles 1)	Test B (fles 2)	Controle 1 (fles 3)	Controle 2 (fles 4)
Urine	ja	ja	ja	Ja, na membraanfiltratie
LAB	ja	ja	nee	Ja, afgedood LAB
Stockoplossing medicijnen	ja	ja	ja	ja
Verhouding Urine:LAB	2:1	2:1	n.v.t.	2:1
Analyse t=0	CZV, VFA, lactaat en pH	CZV, VFA, lactaat en pH	CZV, VFA, lactaat en pH	CZV, VFA, lactaat en pH
Analyse t=0	Geneesmiddelen (1 gezamenlijk monster)		nee	nee

2.3 Analyses

pH

De pH is gemeten met een dagelijks gekalibreerde pH-elektrode.

Vluchtige vetzuren (VFA)

Het gehalte aan vluchtige vetzuren van de opgeloste fractie werd gaschromatografisch bepaald. De voorbereiding van de monsters bestond uit verdunnen van het substraat, tien minuten centrifugeren bij 10000 rpm, en verdunning van het supernatant met 3% mierenzuur. Deze analyse betreft vluchtige vetzuren met een ketenlengte van 2 t/m 5 koolstofatomen (azijnzuur, propionzuur, boterzuur en valeriaanzuur). De detectielimiet was voor elk vetzuur 20 mg/l.

Lactaat

De lactaatconcentratie is gemeten met een HPLC. De voorbereiding van de monsters bestond uit tien minuten centrifugeren bij 10000 rpm, en verdunning van het supernatant met 1.25 mM zwavelzuur.

Chemisch Zuurstof Verbruik (CZV)

De CZV concentratie is bepaald met HACH kits (LCK014).

Geneesmiddelen

De geneesmiddelen zijn geanalyseerd door Aqualysis in Zwolle. Het analysepakket was lcms-gma.

3. Resultaten

De resultaten van de geneesmiddelenanalyses zijn weergegeven in figuur 3-1 en tabel 3-1. De CZV, VFA, pH en lactaatanalyses zijn weergegeven in tabel 3-2.

3.1 Geneesmiddelen

Wat de geneesmiddelen betreft is bij aanvang alleen de stockoplossing met medicijnen gemeten op $t=0$ en een monster van de testflessen A en B gezamenlijk. Op basis van de concentraties in de stockoplossing en de toegevoegde hoeveelheid van deze oplossing aan elke fles is berekend wat theoretisch bij aanvang de concentratie in elke fles geweest moest zijn. Aan het eind is de geneesmiddelconcentratie gemeten in alle 4 flessen. Hieronder worden per stof de resultaten toegelicht.

Carbamazepine

Voor carbamazepine geldt dat de concentratie gemeten aan het eind van de test vergelijkbaar is met de concentratie aan het begin. Deze concentratie is wel iets lager dan in de controleflessen, maar de verschillen zijn erg klein. Er is dus geen afbraak van carbamazepine waargenomen.

Naproxen

Voor naproxen geldt hetzelfde als voor carbamazepine. De concentratie in de testflessen aan het eind is vergelijkbaar met die aan het begin. Ook voor deze stof is dus geen afbraak waargenomen.

Diclofenac

Voor diclofenac valt op dat er wel een lichte afname in concentratie is gemeten tussen aanvang en eind van de test (ong. 7-9 $\mu\text{g/l}$; 20%) maar dat deze afname ook is waargenomen voor de controle met afgedood LAB. In de controle zonder LAB is er geen afname in concentratie. Het lijkt er daarom op dat de lichte afname in concentratie eerder te verklaren is met sorptie aan deeltjes in de LAB-oplossing dan met afbraak.

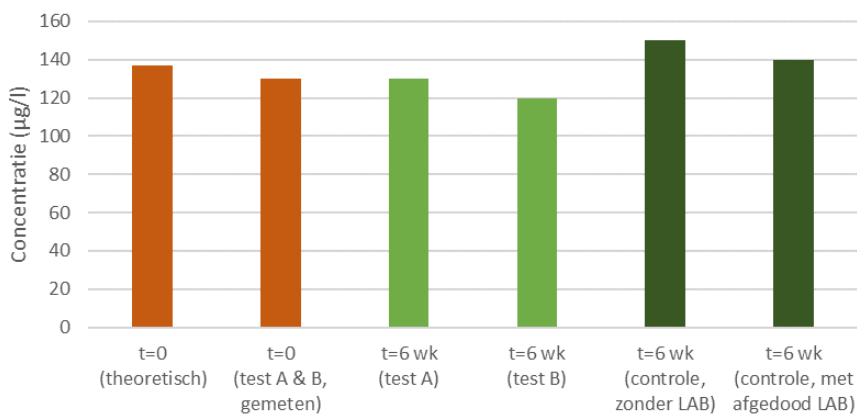
Ibuprofen

De ibuprofenconcentratie in de testflessen is aan het eind duidelijk lager dan bij aanvang (een verschil van ongeveer 50 $\mu\text{g/l}$; 30%). Echter ook in beide controleflessen is een vergelijkbaar lagere concentratie aangetroffen. Met deze testen kan dus niet worden aangetoond dat er sprake is geweest van biologische afbraak. Mogelijk hebben andere processen zoals sorptie een rol gespeeld. Dat de afname ook waargenomen is in de controle zonder LAB laat zien dat de aanwezigheid van LAB niet bepalend is geweest. Juist omdat beide controleflessen een concentratie afname laten zien, is het lastig om de afname te verklaren. Om onzekerheid in de analyse te kunnen uitsluiten zou nog een meting in de tijd nodig zijn.

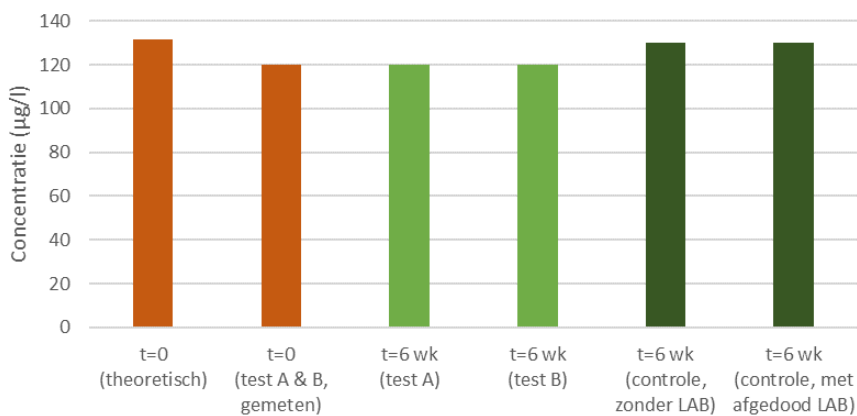
Een opvallende waarneming is dat in de testflessen A en B een lage concentratie metaboliet van ibuprofen is aangetroffen (ong. 2 $\mu\text{g/l}$). Deze stof zat in hetzelfde analysepakket als de vier medicijnen en is daarom mee geanalyseerd. Dit afbraakproduct is niet aangetroffen in de controleflessen. Hoewel in lage

concentraties, duidt dit er wel op dat er enige afbraak van ibuprofen heeft plaatsgevonden.

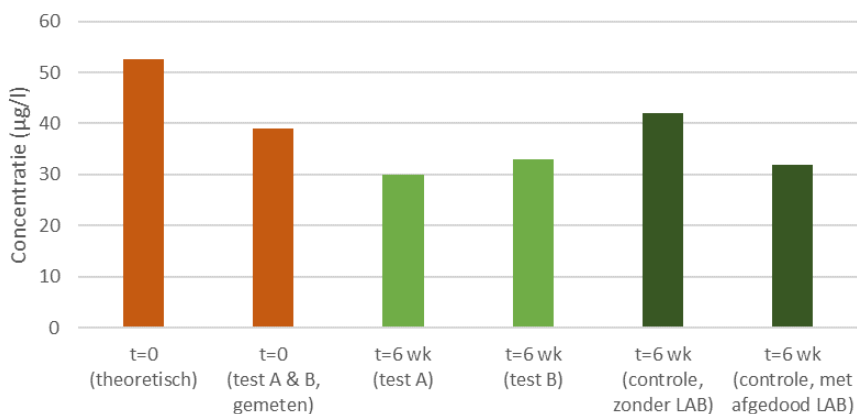
carbamazepine

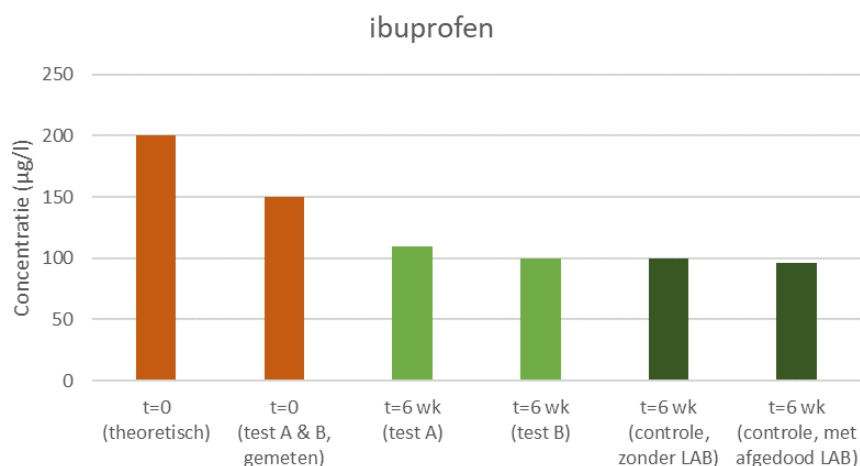


naproxen



diclofenac





Figuur 3-1 Resultaten van de geneesmiddelenanalyses. Alleen van de testflessen is t=0 geanalyseerd. De theoretische waarde bij aanvang van de test is gebaseerd op de analyseresultaten van de stockoplossing met medicijnen.

Tabel 3-1. Samenvatting van de geneesmiddelenanalyses (µg/l).

Fles	Aanvang test		Eind van de test (t=6 weken)			
	Theoretisch ¹	Gemeten test A & B	Test A	Test B	Controle zonder LAB	Controle met afgedood LAB
		1&2	1	2	3	4
Carbamazepine	137	130	130	120	150	140
Diclofenac	53	39	30	33	42	32
Naproxen	131	120	120	120	130	130
Ibuprofen	200	150	110	100	100	96
2-hydroxyibuprofen (metabool van ibuprofen)	<3	<1	1,8	1,7	<0,1	<0,1

¹Gebaseerd op analyses aan de stockoplossing met medicijnen. De stockoplossing bevatte 2600 µg/l carbamazepine, 1000 µg/l diclofenac, 2500 µg/l naproxen en 3800 µg/l ibuprofen en werd in de test 19x verdund.

3.2 pH, CZV, vluchtige vetzuren en lactaatanalyses.

De pH analyses laten een stabiele pH zien in alle flessen. Ook de CZV is vrij stabiel gebleven gedurende de 6 weken.

De vluchtige vetzuren (de zuren van acetaat, propionaat en butyraat, oftewel azijnzuur, propionzuur en boterzuur) laten een toename zien in de testflessen van ongeveer 600 mg/l naar 1600-1700 mg/l. Vooral het acetaatgehalte is in de 6 weken toegenomen. De propionaatconcentratie is licht toegenomen. Dit bevestigt dat de fermentatie goed is verlopen ondanks de aanwezigheid van de medicijnen. Butyraat en valeraat (een ander vetzuur) zijn niet aangetroffen boven de detectielimiet. De controle met afgedood LAB laat een stabiele vluchtige vetzuurconcentratie zien. Dit wijst erop dat hier geen verzuring heeft plaatsgevonden en de biologische activiteit dus inderdaad

geremd is in deze fles, zoals verwacht. In de controle zonder LAB is wel een toename van vluchtige vetzuren waargenomen van 24 naar 366 mg/l. Blijkbaar was in de urine ook enige CZV aanwezig dat kon worden omgezet in acetaat en propionaat en was in het urine/water mengsel ook enige biologische activiteit aanwezig.

De lactaatresultaten moet als indicatief worden beschouwd omdat de matrix van de monsters de nauwkeurigheid van de meting negatief beïnvloedde. Er is alleen lactaat aangetroffen in de flessen waaraan de LAB-oplossing is toegevoegd. Verder lijkt er een lichte toename van de lactaat in de testflessen. Door de matrixproblemen kan dit echter met niet zekerheid worden vastgesteld.

Tabel 3-2. Samenvatting van de pH, CZV, vluchtige vetzuren en lactaatanalyses.

	Eenheid	Aanvang test (t=0)				Eind van de test (t=6 weken)			
		Test A	Test B	Controle zonder LAB	Controle afgedood LAB	Test A	Test B	Controle zonder LAB	Controle afgedood LAB
pH	-	4,4	4,4	6,4	4,6	4,4	4,4	6,7	4,6
CZV	mg/l	29320	29545	4400	19805	31445	31795	4198	21760
Lactaat ¹	mg/l	2000	1800	<50	1500	2500	2500	<50	1100
Vluchtige vetzuren	mg CZV/l	567	607	25	520	1665	1641	630	526
Acetaat	mg/l	532	569	24	488	1500	1473	366	493
Propionaat	mg/l	<20	<20	<20	<20	43	46	63	<20
Butyraat	mg/l	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20
Valeraat	mg/l	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20

¹De lactaatresultaten zijn indicatief vanwege storende componenten in de matrix.

4. Conclusies & aanbevelingen

4.1 Conclusies

Om te bepalen in hoeverre er afbraak van medicijnen plaatsvindt tijdens de fermentatie van urine met melkzuurbacteriën zijn verkennende testen uitgevoerd. Aan humane urine zijn 4 medicijnen gespiked in een concentratie van 50-200 µg/l. Daarnaast zijn melkzuurbacteriën toegevoegd, waarna na een testperiode van 6 weken is onderzocht of er sprake is van een afname in de medicijnconcentratie.

Tijdens deze fermentatie van urine met melkzuurbacteriën heeft geen duidelijke concentratieafname van carbamazepine en naproxen plaatsgevonden.

Voor diclofenac was er sprake van een lichte afname in concentratie, maar waarschijnlijk niet als gevolg van biologische afbraak.

Voor ibuprofen is de grootste afname in de concentratie waargenomen, maar er kan niet met zekerheid worden vastgesteld of dit het gevolg is van biologische afbraak, andere (abiotische) processen of dat het te maken heeft met de meetonzekerheid in de bepaling omdat deze afname ook in beide controleflessen zijn waargenomen.

4.2 Aanbevelingen

Voor vervolgonderzoek is de aanbeveling om te onderzoeken of met een langere testperiode en meerdere monsters in de tijd de afname in de ibuprofen concentratie kan worden bevestigd. NB. Op het moment van schrijven van dit rapport zijn de testflessen met restant van de vloeistof nog bewaard gebleven bij 20°C. Deze flessen zouden nogmaals bemonsterd en geanalyseerd kunnen worden (het is wel de vraag in hoeverre de controle met afgedood LAB nog inactief is).

Als wordt bevestigd dat ibuprofen (enigzins) kan worden afgebroken, zou kunnen worden gekeken of andere medicijnen die net als ibuprofen goed op een RWZI kunnen worden verwijderd, zoals paracetamol, ook verwijderd kunnen worden tijdens fermentatie.

Als de medicijnen uit urine moeten worden verwijderd, kan ook worden gekeken naar andere opties dan afbraak onder anaerobe condities. Er zou bijvoorbeeld kunnen worden gekeken naar verwijdering door sorptie aan actief kool of een ander medium.