

POLITECHNIKA KOSZALIŃSKA  
WYDZIAŁ INŻYNIERII LĄDOWEJ, ŚRODOWISKA I GEODEZJI



ROZPRAWA DOKTORSKA nt:

**Biodegradacja wybranych modulatorów hormonalnych w procesach technologicznych i w warunkach naturalnych**

Magdalena Ślęczka

Praca doktorska wykonana  
w Zakładzie Toksykologii i Bioanalitiky

Promotor:

Dr hab. Paweł K. Zarzycki, prof. nadzw. PK

**Koszalin 2013**

### 13. STRESZCZENIE

#### Biodegradacja wybranych modulatorów hormonalnych w procesach technologicznych i w warunkach naturalnych

Niniejsza rozprawa doktorska poświęcona jest badaniu wybranych frakcji modulatorów hormonalnych (w zakresie polarności estetrol-progesteron) obecnych w ekosystemach wodnych, ściekach komunalnych i w trakcie technologicznych procesów ich oczyszczania. Wykorzystując rozdzielanie mikrochromatograficzne oraz wielowariancyjną analizę danych badano przemiany mikrozanieczyszczeń w rzeczywistych próbkach środowiskowych. Rozdzielanie oraz oznaczanie ilościowe ekstraktów SPE (*solid-phase extraction*) zostało zoptymalizowane dla celów szybkich i tanich badań przesiewowych próbek wody pobieranych z ekosystemów wodnych obszaru Pomorza Środkowego. Ponadto, metodologia umożliwiła analizę substancji organicznych zawartych w materiałach o dużej zawartości matrycy związków organicznych, takich jak ściek nieoczyszczony, materiał komór denitryfikacyjnych/nitryfikacyjnych oraz ściek oczyszczony. Materiały te były pobierane z oczyszczalni ścieków komunalnych Jamno zlokalizowanej w pobliżu Koszalina. Analizowane próbki środowiskowe zawierały związki chemiczne w zakresie polarności estetrol-progesteron, w tym barwniki chlorofilowe – izolowane zoptymalizowaną procedurą SPE przy użyciu adsorbentu C18. W pracy dokonano optymalizacji rozdzielania mikro-TLC (włączając w to rozdzielanie dwukierunkowe) oraz walidacji metody w oparciu o elementarne kryteria rozdzielania, ilość pasm na chromatogramie, asymetrię pików, intensywność sygnału oraz parametr  $\log \Pi \Delta h R_F$ . Wyniki rozdzielania i detekcji w trybie fluorescencji (UV366/Vis) oraz chemicznej (przy zastosowaniu kwasu fosforomolibdenowego; PMA) przedyskutowano w porównaniu do wyników ilościowych uzyskiwanych za pomocą aparatury HPLC UV-DAD. Wykazano, iż oba tryby detekcji mikro-TLC są w stosunku do siebie komplementarne i umożliwiają uzyskanie informacji przydatnej w klasyfikacji oraz identyfikacji próbek. Wyniki analizy chemometrycznej z użyciem PCA (principal components analysis) wskazują, iż ekstrakty SPE frakcji związków niskocząsteczkowych o polarności w zakresie estetrol-progesteron są stabilne w długim okresie czasu (przechowywane ponad 4 lata w temperaturze -20°C). Analiza danych ilościowych uzyskanych z wybranych ekosystemów wodnych, w okresie

od lipca do grudnia 2011, wykazała brak jednoznacznego grupowania się obiektów badań ze względu na sezonowość, co sugeruje wysycenie ekosystemów badaną frakcją związków, na poziomach stężeń ng i pg/L. Przeprowadzono monitoring tej frakcji w trakcie procesów technologicznych oczyszczalni ścieków komunalnych Jamno, w okresie 7 dni. W szczególności analizowano materiał pochodzący z komór denitryfikacyjnych i nityfikacyjnych oraz ścieku nieoczyszczonego i oczyszczonego. Stwierdzono, że wybrana frakcja mikrozanieczyszczeń uwidaczniana na mikrochromatogramach w trybie detekcji fluorescencyjnej nie jest usuwana w trakcie procesów technologicznych oczyszczalni ścieków Jamno. Podobne rezultaty uzyskano analizując mikrochromatogramy rejestrowane w trybie detekcji chemicznej, przy czym stwierdzono, że główny proces biodegradacji zachodzi w komorze denitryfikacyjnej. Analiza statystyczna danych ilościowych dotyczących pomiarów fizykochemicznych oraz mikro-TLC wskazuje, że typowe procesy technologiczne nie redukują w sposób efektywny mikrozanieczyszczeń charakteryzujących się polarnością w zakresie estetrol-progesteron.

## 14. ABSTRACT

### Biodegradation of selected hormonal modulators under technological processes and natural environmental conditions

This PhD dissertation deals with investigation of selected fraction of hormonal modulators (characterized by polarity range from estetrol to progesterone) present in water ecosystems and municipal sewage water samples during technological processes of wastewater treatment. Based on methodological approach involving micro-TLC quantification and multivariate data mining biodegradation of such chemicals in real environmental samples was investigated. Micro-TLC separation and quantification of SPE (*solid-phase extraction*) extracts were optimized for fast and low-cost screening of water samples collected from lakes and rivers located in the area of Middle Pomeranian in northern part of Poland. Moreover, highly organic compounds loaded treated and untreated sewage waters, particularly, from denitrification/nitrification chambers obtained from municipal wastewater treatment plant "Jamno" near Koszalin, were studied. Analyzed environmental samples contained number of substances characterized by polarity range from estetrol to progesterone as well as chlorophyll-related dyes, which were isolated and pre-purified by simple SPE protocol involving C18 cartridges. Optimization of micro-TLC separation (including 2D mode) and validation of quantification protocol for samples of interest were discussed from the practical point of view using simple separation efficiency criteria including total peaks number,  $\log \Pi \Delta h R_F$ , signal intensity and peak asymmetry. Outcomes of the presented analytical approach, especially using detection involving direct fluorescence (UV366/Vis) and phosphomolybdic acid (PMA) visualization were compared with HPLC UV-DAD generated data reported previously. It has been proved that both fluorescence and PMA derived data sets capture key information about origin of each sample nevertheless, both visualization methods may capture complementary and discrete information concerning ecosystems studied. Chemometric investigation based on principal components analysis (PCA) revealed that SPE water ecosystems extracts separated by micro-TLC and detected under fluorescence and PMA visualization modes can be used for robust sample fingerprinting even after long-term storage of the extracts (up to 4 years) at subambient temperature (-20°C). Quantitative data obtained from surface

water samples that were being collected monthly for half a year in the summer, autumn and early winter period (between July and December of 2011) indicated that there are no significant changes in the component of interest levels according to seasons studied, which strongly suggest that analyzed water ecosystems may be saturated with investigated fractions of chemicals at ng and pg/L level. Biodegradation of such compounds fraction was also investigated during technological processes of wastewater treatment, within 7 days period. Particularly, samples from denitrification and nitrification chambers as well as untreated and treated sewage water were analyzed. It has been found that micropollutants detected by fluorescence mode in the SPE extracts cannot be efficiently removed from the wastewater material by technological processes conducted in Jamno treatment plant. Similar results were obtained using chemical detection (PMA) however, this investigation shows that main organic compounds biodegradation process takes place in denitrification chamber. Statistical exploration based on quantitative data originated from physicochemical measurements and micro-TLC strongly indicate that typical technological processes cannot efficiently remove micropollutants characterized by polarity range from estetrol to progesterone from sewage water.