

Dorota DOMARADZKA, Urszula GUZIK, Danuta WOJCIESZYŃSKA\*

## **NAPROKSEN – TRUDNO DEGRADOWANY LEK PRZECIWPALNY I JEGO BIOTRANSFORMACJA PRZEZ *BACILLUS* SP. B1(2015B)**

Gram-dodatni szczep *Bacillus* sp. B1(2015b) był zdolny do biotransformacji 6,0 mg/l naproksenu. W warunkach monosubstratowych biotransformacja zachodziła na poziomie 24% w ciągu 35 dni prowadzenia hodowli. Równocześnie obserwowano zmniejszenie się gęstości optycznej hodowli, co wskazywało, że naproksen nie jest wystarczającym źródłem węgla i energii dla szczepu B1 (2015b). W warunkach kometabolicznych z glukozą obserwowano całkowitą degradację leku z równoczesnym wzrostem hodowli bakteryjnej. Ponadto w hodowli zidentyfikowano O-desmetylonaproksen jako intermediat. Od 29 dnia prowadzenia hodowli obserwowano zmniejszanie się stężenia desmetylonaproksenu oraz zanik pozostałych metabolitów, co może wskazywać na całkowitą degradację naproksenu.

### 1. WSTĘP

Według badań GUS przeprowadzonych w okresie wrzesień–grudzień 2014 roku, niesterydowe leki przeciwzapalne (NLPZ) są jednymi z najczęściej kupowanych leków bez recepty w Polsce [12]. Naproksen należy do grupy wielopierścieniowych NLPZ, pochodnych naftalenu i hamuje cyklooksygenazy (COX-1 i COX-2), które katalizują utlenienie i cyklizację kwasu arachidonowego, prowadząc do powstania czynników biologicznych takich jak prostaglandyny, prostacykliny i tromboksan. Stąd też lek ten wykazuje działanie przeciwbólowe i przeciwzapalne [3, 7]. Naproksen wydalany jest w niewielkiej ilości z moczem w formie niezmienionej, natomiast większość związków ulega sprzężaniu z kwasem glukuronowym. Ponadto ok. 20% stanowią jego demetylowane pochodne, a ok. 10% ulega sprzężaniu z siarczanami [8]. Tradycyjne technologie

---

\* Uniwersytet Śląski, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biochemii, ul. Jagiellońska 28, 40–032 Katowice, doroteadomar@gmail.com.

oczyszczania ścieków nie eliminują tego typu zanieczyszczeń, dlatego wydalany naproksen oraz jego metabolity trafiają do wód powierzchniowych oraz wody pitnej [4, 32]. Obecność naproksenu w środowisku wodnym, która waha się w Polsce w stężeniach od 80 do 750 ng/l, nie jest obojętna dla organizmów żywych [6, 16]. Parrot i in. [22] zaobserwowali zniekształcenie jaj w pierwszym pokoleniu ryb *Pimephales promelas*, które były eksponowane na działanie mieszaniny leków (naproksen, diklofenak, gemfibrozil, triklosan, acetaminofen, kwas salicylowy) w stężeniu 100 ng/l oraz 300 ng/l. Wykazano wpływ naproksenu na wzrost i wykluwanie jaj *Jordanella floridae*, żerowanie stulbi (*Hydra attenuata*) oraz opóźnienie rozwoju larw płazów *Limnodynates peronii* [20, 21, 23]. Potencjalna bioakumulacja naproksenu w łańcuchu pokarmowym oraz toksyczność chroniczna są problemami, które wymagają rozwiązania. Znane są dwie drogi eliminacji NLPZ ze środowiska: fizyczno-chemiczna oraz biologiczna. Często stosowanymi metodami fizyczno-chemicznymi są fotodegradacja i naświetlanie promieniem gamma. Hsu i in. [15] oznaczyli 1(6-metoksy-naftalen-2-ilo) etanol, 1(6-metoksy-naftalen-2-ilo) etanon, metyl 2-(6-metoksy-naftalen-2-ilo) propionian oraz 2-etyl-6-metoksy-naftalen jako produkty fotodegradacji. Testy toksyczności wykazały, że produkty te są bardziej toksyczne od związku macierzystego. W badaniach tych wykorzystano promieniowanie słoneczne, gdyż w środowisku naturalnym naproksen prawdopodobnie podlega podobnym transformacjom do badanych toksycznych intermedatów. Zastosowanie promieniowania gamma również nie powoduje całkowitej degradacji leku, a jedynie jego dekarboksylację [35].

Alternatywą dla metod fizyczno-chemicznych jest degradacja NLPZ na drodze biologicznej. Transformację naproksenu do tej pory prowadzono głównie z udziałem grzybów: *Trametes versicolor*, *Aspergillus niger*, *Cunninghamella elegans*, *C. echinulata*, *C. blakesleeana*, *Phanerochaete chrysosporium* oraz osad czynny [14, 19, 25, 36]. Fernandez-Fontaina i in. [11] wykazali całkowitą biotransformację przez osad czynny 100 µg/l naproksenu, z 1(6-metoksy-naftalen-2-ilo) etanolem jako intermedatem, w warunkach nityfikacji. Autorzy sugerują, że duża aktywność monooksygenazy amonowej podczas procesu nityfikacji przyczyniła się do wydajnej biotransformacji leku. Ostatnio pojawiły się również publikacje dotyczące biologicznej transformacji naproksenu przez izolowane szczepy: *Stenotrophomonas maltophilia* KB2, *Planococcus* sp. S5 oraz *Pseudomonas stutzeri*, w warunkach kometabolicznych. Kometabolizm jest często stosowany w układach badawczych, których celem jest mineralizacja trudno degradowanych substancji. Wprowadzenie czynnika wzrostowego przyczynia się do wzrostu biomasy mikroorganizmów, a tym samym stymuluje transformację ksenobiotyku [5, 9, 10, 29, 33].

Ze względu na dużą konsumpcję i nieefektywne usuwanie naproksenu w oczyszczalniach ścieków oraz potencjalną bioakumulację leku i jego metabolitów konieczne jest poszukiwanie mikroorganizmów, które byłyby zdolne do całkowitej mineralizacji naproksenu. Niniejsza praca jest kontynuacją badań nad biotransformacją naproksenu

w warunkach kometabolicznych, w których zastosowano gram dodatni szczep *Bacillus* sp. B1(2015b).

## 2. METODYKA BADAŃ

### 2.1. ZASTOSOWANY SZCZEP BAKTERII I WARUNKI HODOWLI

Użyty w badaniach szczep *Bacillus* sp. B1(2015b) został wyizolowany z terenów składowania odpadów poprodukcyjnych nawozów i środków ochrony roślin Zakładu Chemicznego Organika-Azot S.A. w Jaworznie. Szczep namnażano w bulionie odżywczym w temperaturze 30°C, w warunkach wytrząsania 130 rpm przez 24 h. Po tym czasie hodowle odwirowywano (5000 x g w 4°C, przez 15 min), przemywano sterylną pożywką mineralną i używano jako innokulum w dalszych badaniach. Biotransformacja naproksenu była prowadzona w układzie monosubstratowym oraz kometabolicznym, w pożywce mineralnej o składzie: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O - 3,78 g/l; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 0,5 g/l; NH<sub>4</sub>Cl - 5,0 g/l; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 0,2 g/l; ekstrakt drożdżowy - 0,01 g/l (pH 7,1-7,3). Do każdego układu wprowadzano wcześniej przygotowane innokulum, w takich ilościach, aby w hodowlach monosubstratowych gęstość optyczna przy  $\lambda = 600$  nm wynosiła ok. 1,0, natomiast w hodowlach kometabolicznych ok. 0,1. Naproksen, jako sól sodową w stężeniu 6,0 mg/l dodawano do każdego układu badawczego. Do hodowli kometabolicznych dodatkowo wprowadzano glukozę w stężeniu 0,5 g/l, jako substrat wzrostowy. W trakcie trwania hodowli monitorowano gęstość optyczną, poprzez pomiar absorbancji światła przy  $\lambda = 600$  nm (OD<sub>600</sub>). Jeśli wartość OD<sub>600</sub> była większa lub równa 1,3 w układzie kometabolicznym, to do hodowli nie dodawano substratu wzrostowego. Układy hodowlane były prowadzone w trzech powtórzeniach w warunkach wytrząsania 130 rpm, w 30°C. Hodowle monosubstratowe prowadziło przez 35 dni, natomiast kometaboliczne przez 29 dni.

### 2.2. OZNACZENIE STĘŻENIA SUBSTRATÓW

Stężenie naproksenu w hodowli oznaczano przy użyciu chromatografu cieczowego (Merck HITACHI) wyposażonego w kolumnę Ascentis® Express C18 (10 cm x 4,6 mm; 2,7  $\mu$ m) o odwróconym układzie faz, przedkolumnę OPTI-SOLV® EXP i detektor UV/VIS typu DAD. Faza ruchoma składała się z 1% kwasu octowego i acetonitrylu (50:50% v/v), przepływ wynosił 1 ml/min. Detekcję związku obserwowano przy długości fali  $\lambda = 260$  nm. Do oznaczenia naproksenu pobierano 1,5 ml próbek i odwirowywano (14000 rpm, 20 min). Badany lek, w supernatancie, zidentyfikowano na podstawie spektrum UV-VIS roztworu wzorcowego [33]. W celu identyfikacji metabolitu pośredniego wykorzystano roztwór wzorcowy desmetylonaproksenu. Stężenie metabolitu

kontrolowano z wykorzystaniem opisanej powyżej metody do oznaczania stężenia naproksenu.

Stężenie glukozy oznaczano za pomocą metody antronej [27].

### 2.3. ANALIZA STATYSTYCZNA

Badanie przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Wyniki zostały zanalizowane przy użyciu programu STATISTICA PL 12.5.192.18.

## 3. WYNIKI I DYSKUSJA

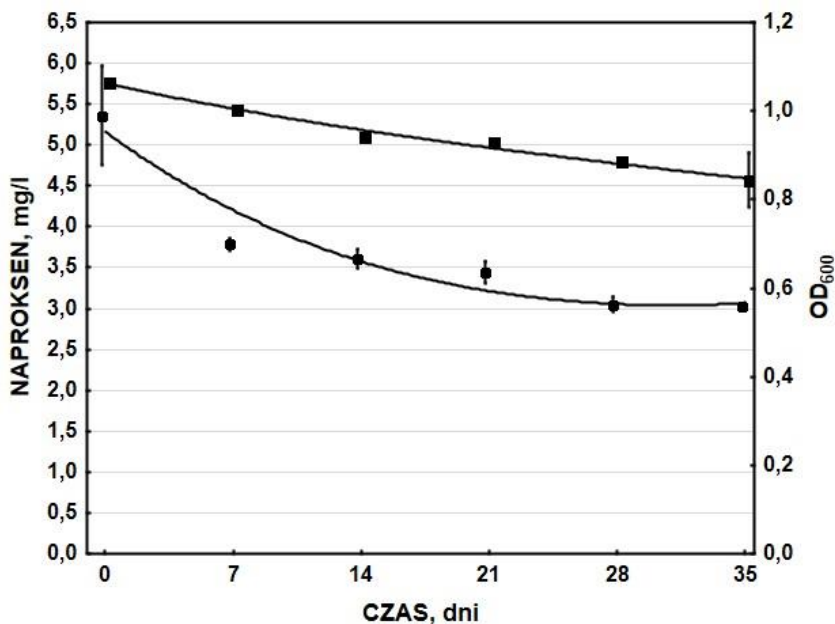
### 3.1. BIOTRANSFORMACJA NAPROKSENU W HODOWLACH MONOSUBSTRATOWYCH

Coraz częściej, w procesach usuwania związków ksenobiotycznych ze środowiska stosuje się metody biologiczne, z zastosowaniem mikroorganizmów posiadających wyspecjalizowane układy enzymatyczne, zaangażowane w rozkład struktury ksenobiotyku. Jest to również tańsza alternatywa dla metod fizyczno-chemicznych. Jednak wciąż konieczne jest poszukiwanie szczepów zdolnych do biotransformacji NLPZ, co umożliwiłoby w przyszłości opisanie szlaku degradacji tych farmaceutyków, jak również metod monitoringu NLPZ w środowisku [11, 24, 26, 28].

Tereny poprodukcyjne zakładu Organika-Azot S.A. w Jaworznie są silnie zanieczyszczone o czym świadczy odczyn pH, obecność fenoli, cyjanów, metali ciężkich (m.in. Zn, Hg), substancji czynnych anionowo i innych związków takich jak: sześćchlorocykloheksan, DDT, chlorfeninfos [34]. Ze względu na obecność dużej ilości związków posiadających strukturę aromatyczną i trudne warunki środowiskowe, tereny te zostały wybrane do skringingu szczepów bakterii, które byłyby zdolne transformować naproksen. Wyizolowany gram-dodatni szczep, *Bacillus* sp. B1(2015b), transformował naproksen w 24%, w układzie monosubstratowym (rys. 1).

Uznaje się, że gram-ujemne bakterie są bardziej odporne na ksenobiotyki występujące w środowisku, niż bakterie gram-dodatnie, ze względu na obecność zewnętrznej błony komórkowej, co umożliwia regulację jej przepuszczalności przez zmianę składu fosfolipidów, a także aktywne usuwanie ksenobiotyków z komórki [30, 13]. Jednakże gram-dodatnie bakterie również wykazują zdolność do degradacji związków aromatycznych. Przykładem jest biotransformacja naftalenu przez *Bacillus fusiformis* (BFN) oraz *Bacillus naphthovorans*, a także pentachlorofenolu przez *Bacillus cereus* [18, 37, 31]. Badania te potwierdzają, że bakterie z rodzaju *Bacillus* wykazują zdolność transformacji toksycznych związków aromatycznych o złożonych strukturach, takich jak naftalen i pochodne fenolu. *Bacillus* sp. B1(2015b) jest do tej pory dopiero drugim z kolei opisanym gram-dodatnim szczepem, który wykazuje zdolność biotransformacji naproksenu. Jednak w porównaniu do opisanego

wcześniej gram-dodatniego szczepu *Planococcus* sp. S5, szczep *Bacillus* sp. B1(2015b) odznaczał się większą zdolnością do degradacji oraz mniejszym zamieraniem hodowli w układach monosubstratowych [9].



Rys. 1. Biotransformacja naproksenu jako źródło węgla i energii  
(• stężenie naproksenu, • gęstość optyczna)

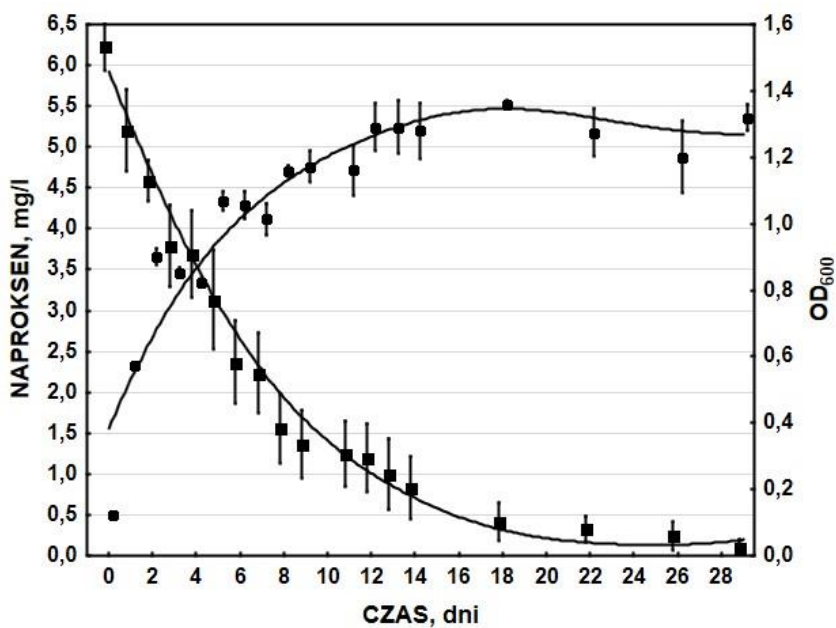
Naprosken był również biotransformowany w hodowlach bakterii gram-ujemnych oraz grzybów. Szczep *Pseudomonas* sp. CE21 transformował w 78% 0,01 mg/l oraz w 100% 0,1 mg/l naproksenu w przeciągu trzech dni, natomiast *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 28% 6,0 mg/l przez 35 dni. Wydajniejszą biotransformację naproksenu wykazano w hodowlach grzybów. Naprosken w stężeniu 10 mg/l oraz 55  $\mu$ g/l był całkowicie eliminowany przez *Trametes versicolor* odpowiednio po 6 godz. i 5 godz. inkubacji, jak również w hodowli *Phanerochaete chrysosporium*, w stężeniu 0,001 g/l, po 4 dniach. Należy jednak zaznaczyć, że w hodowlach grzybów obserwowano akumulację farmaceutyku na ich powierzchni, której nie obserwowano w hodowlach abiotycznych bakterii [17, 19, 26, 33].

### 3.2. BIOTRANSFORMACJA NAPROKSENU W WARUNKACH KOMETABOLICZNYCH

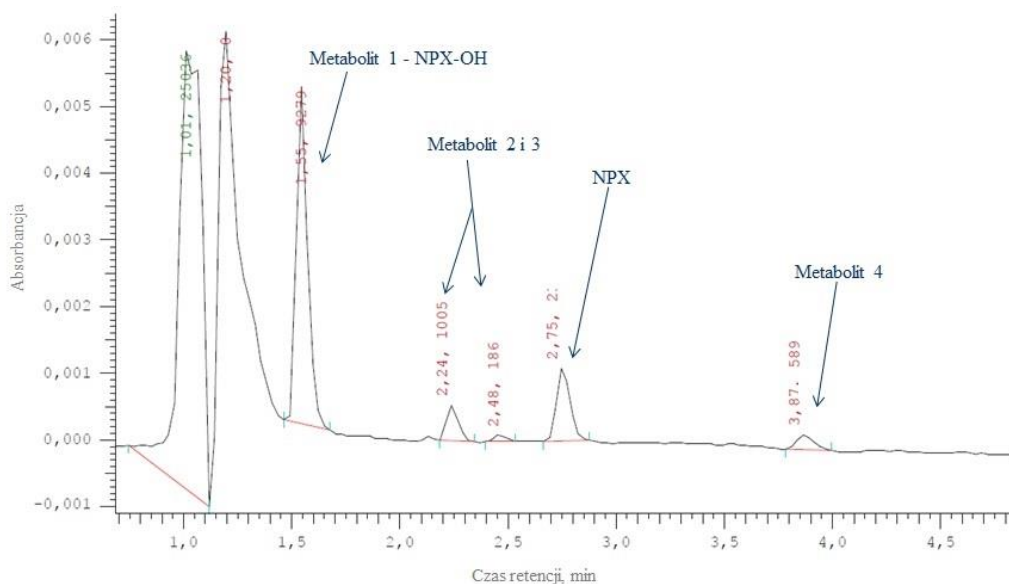
Niektóre mikroorganizmy zdolne są degradować ksenobiotyki jedynie w układach kometabolicznych. Wielopierścieniowe związki aromatyczne występują w środowisku w mieszaninie różnych substancji, łatwiej bądź trudniej biodostępnych, dlatego zastosowanie układów kometabolicznych znajduje swoje uzasadnienie [1, 2, 25]. Jedne z pierwszych badań, nad degradacją naproksenu przez osad czynny pokazały, że dodatkowe źródło węgla nie tylko zwiększa wydajność transformacji, lecz często wręcz ją umożliwia [24]. Dodatek ligninolitycznych związków do gleby, w której prowadzono biotransformację naproksenu przez *Trametes versicolor*, wpłynęło pozytywnie na produkcję lakazy, w konsekwencji zmniejszając stężenie leku w układzie badawczym [2]. W hodowli *Phanerochaete chrysosporium*, w obecności glukozy jako substratu wzrostowego, obserwowano natomiast całkowitą transformację mieszaniny farmaceutyków: naproksenu, ibuprofenu i diklofenaku [25].

Zastosowanie dodatkowego źródła węgla, w hodowlach *Stenotrophomonas maltophilia* KB2, *Planococcus* sp. S5 oraz *Pseudomonas stutzeri* zwiększyło biotransformację naproksenu. Wykazano, że glukoza jest najlepszym substratem promującym wzrost tych szczepów, czego skutkiem była duża transformacja leku: w hodowli *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 wynosiła 78%, *Planococcus* sp. S5 - 50%, natomiast *Pseudomonas stutzeri* - 59 % w ciągu 35 dni [9, 10, 33]. W hodowlach kometabolicznych *Bacillus* sp. B1(2015b), w których użyto glukozy jako substratu wzrostowego, naproksen był transformowany w ok. 98 % (rys. 2). Glukoza była całkowicie degradowana w ciągu 20 godzin prowadzenia hodowli. Największy ubytek leku obserwowano w pierwszych dniach hodowli – do 8 dnia, któremu towarzyszył intensywny wzrost hodowli. Oprócz stężenia naproksenu monitorowano pojawiające się metabolity pośrednie, których nie obserwowano w hodowlach monosubstratowych (rys. 3). W hodowli pojawiły się cztery metabolity pośrednie, których widma UV/VIS były zbliżone do widma naproksenu. Metabolit 1, o czasie retencji 1,23, na podstawie wzorca został zidentyfikowany jako *O*-desmetylonaproksen. Najwyższe stężenie metabolitu 1 wynosiło ok.  $4,431 \pm 0,096$  mg/l w 26 dniu hodowli, natomiast stężenie naproksenu w tym dniu było na poziomie ok.  $0,145 \pm 0,005$  mg/l. Zmniejszeniu stężenia naproksenu w hodowli towarzyszył wzrost stężenia *O*-desmetylonaproksenu, następnie obserwowano zmniejszenie się stężenia *O*-desmetylonaproksenu i zanik pozostałych metabolitów pośrednich (rys. 4). Wskazuje to na całkowitą degradację naproksenu przez *Bacillus* sp. B1(2015b). Ponadto obecność metabolitów pośrednich pozwoli w przyszłości na opisanie szlaku degradacji naproksenu.

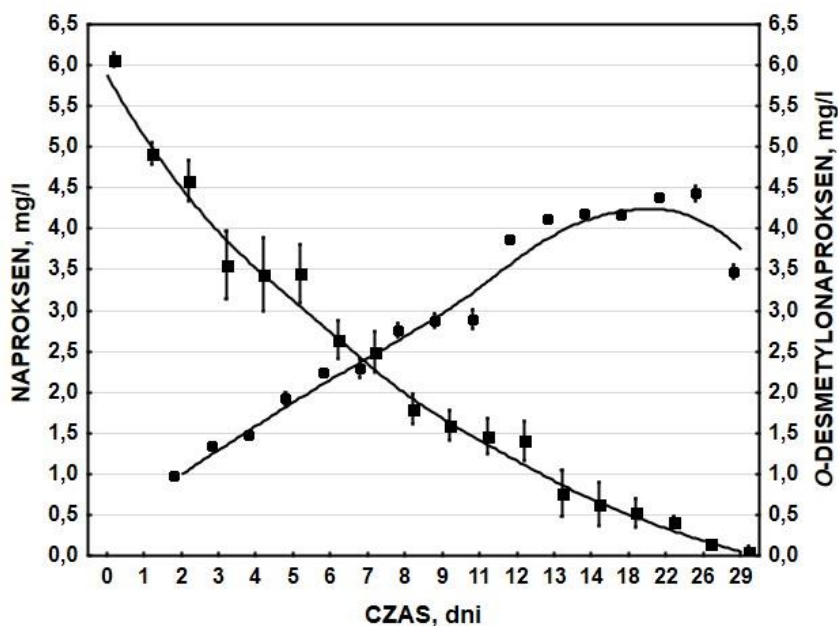
*O*-desmetylonaproksen jest często występującym metabolitem naproksenu podczas mikrobiologicznej transformacji leku. Jego obecność w hodowlach grzybów jest wynikiem aktywności cytochromu P-450, którego aktywność oznaczono w hodowlach *Aspergillus niger*, *Cunninghamella elegans* oraz *Trametes versicolor* [14, 19, 36]. W osadzie czynnym również dochodziło do hydroksylacji pierścienia aromatycznego w pozycji C5 [24].



Rys. 2. Biotransformacja naproksenu jako kometabolitu (■ stężenie naproksenu, ● gęstość optyczna)



Rys. 3. Chromatogram otrzymany z hodowli kometabolicznej z glukozą *Bacillus* sp. B1(2015b)



Rys. 4. Zmiany stężenia naproksenu i O-desmetylonaproksenu w układzie kometaabolicznym (• stężenie naproksenu, • stężenie O-desmetylonaproksenu)

Naproksen może być w różny sposób hydroksylowany. Fernandez–Fontaina i in. [11] wykazali hydroksylację łańcuchu propionowego naproksenu w badaniach nad jego rozkładem przez osad czynny w bioreaktorach nityfikacyjnych. Przypuszczalnie wynika to z aktywności monooksygenazy amonowej. W hodowli *Aspergillus niger* oznaczono 7-hydroksynaproksen oraz 7-hydroksy–O-desmetylonaproksen. W hodowli *Stenotrophomonas maltophilia* KB2, natomiast zaproponowano szlak degradacji naproksenu, na podstawie oznaczonej aktywności enzymów, poprzez 7,8-dihydroksynaproksen i 5,7,8-trihydroksynaproksen. Hydroksylacja pierścienia naproksenu potencjalnie umożliwia jego rozszczepienie przez dioksygenazy rozszczepiające [14, 33].

### 3.3. PODSUMOWANIE

*Bacillus* sp. B1(2015b), wyizolowany z terenów poprodukcyjnych Zakładów Organika Azot S.A., całkowicie transformował naproksen w hodowlach kometaabolicznych z glukozą w ciągu 29 dni. Jest to największa do tej pory obserwowana biotransformacja leku w czystych kulturach bakterii w warunkach kometaabolicznych. Ponadto zidentyfikowano O-desmetylonaproksen jako metabolit naproksenu. Konieczne są jednak dalsze



badania, by można było stwierdzić, że *Bacillus* sp. B1(2015b) całkowicie degraduje naproksen.

*Projekt finansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki (2013/09/B/NZ9/00244).*

#### LITERATURA

- [1] ARULAZHAGAN P., SIVARAMAN C., KUMAR S.A., ASLAM M., BANU J.R., *Co-metabolic degradation of benzo(e)pyrene by halophilic bacterial consortium at different saline condition*, Journal of Environmental Biology, 2014, Vol. 35, No. 3, 445–452.
- [2] BORRAS E., LLORENS-BLANCH G., RODRIGUEZ-RODRIGUEZ C.E., SARRA M., CAMINAL G., *Soil colonization by Trametes versicolor grown on lignocellulosic materials: substrate selection and naproxen degradation*, International Biodeterioration and Bioderadation, 2011, Vol. 65, No. 6, 846–852.
- [3] BURDAN F., CHAŁAS A., SZUMIAŁO J., *Cyklooksygenaza i prostanoidy – znaczenie biologiczne*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 2006, Vol. 60, 129–141.
- [4] CARMONA E., ANDREU V., PICO Y., *Occurrence of acidic pharmaceuticals and personal care products in Turia River Basin: From waste to drinking water*, Science of the total Environment, 2014, Vol. 484, No. 1, 53–63.
- [5] CORNELISSEN G., SIJM D., *An energy budget model for the biodegradation and cometabolism of organic substances*, Chemosphere, 1996, Vol. 33, No. 5, 817–830.
- [6] CRANE M., WATTS C., BOUCARD T., *Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals*, Science of the Total Environment, 2006, Vol. 367, No. 1, 23–41.
- [7] CRYER B., FELDMAN M., *Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used non-steroidal anti-inflammatory drugs*, The American Journal of Medicine, 1998, Vol. 104, No. 5, 413–421.
- [8] CZUBA E., KLIMOWICZ A., BIELECKA-GRELA S., KACALAK-RZEPKA A., *Wpływ wybranych izoenzymów cytochromu P-450 na niesterydowe leki przeciwpalne*, Postępy Dermatologii i Alergologii, 2009, Vol. 26, No. 6, 529–532.
- [9] DOMARADZKA D., GUZIK U. HUPERT-KOCUREK K., WOJCIESZYŃSKA D., *Cometabolic degradation of naproxen by Planococcus sp. strain S5*, Water, Air and Soil Pollution, 2015, Vol. 9, 226–297.
- [10] DOMARADZKA D., GUZIK U., WOJCIESZYŃSKA D., *Biotransformacja naproksenu przez szczep Pseudomonas stutzeri*, Interdyscyplinarne Zagadnienia w Inżynierii i Ochronie Środowiska, 2014, Vol. 4, 173–182.
- [11] FERNANDEZ-FONTAINA E., GOMES I.B., AGA D.S., OMIL F., LEMA J.M., CARBALLA M., *Biotransformation of pharmaceuticals under nitrification, nitrataion and heterotrophic conditions*, Science of the Total Environment, 2016, Vol. 541, No 1439–1447.
- [12] GŁÓWNY URZĄD STATYSTYCZNY, *Zdrowie i zachowanie zdrowotne mieszkańców Polski w świetle Europejskiego Ankietowego Badania Zdrowia (EHIS) 2014 r.*, Warszawa 2015, 1–12.
- [13] GREŃ I., GAŚCZAK A., BARTELEMUS G., LABUŹEK S., *Diversity of mixed microorganism population after screening in the presence of selected VOCs*, Proceedings of ECOpole, 2010, Vol. 4, No. 1, 55–60.
- [14] HE A., ROSAZZA J.P.N., *Microbial transformations of S-naproxen by Aspergillus niger ATCC 9142*, 2003, Pharmazie, Vol., 58, No. 6, 420–422.

- [15] HSU Y.H., LIOU Y.B., LEE J.A., CHEN C.Y., WU A.B., *Assay of naproxen by high-performance liquid chromatography and identification of its photoproducts by LC-ESI MS*, Biomedical chromatography, 2006, Vol. 20, No. 8, 787–793.
- [16] KOWALSKI B., *Oznaczenie wybranych leków z różnych grup terapeutycznych w wodach powierzchniowych z zastosowaniem technik chromatograficznych*, [w:] Rozprawa doktorska, Politechnika Śląska, Gliwice 2011, 6–122.
- [17] LIN B., LYU J., LYU X.J., YU H.Q., HU Z., LAM J.C., *Characterization of cephalixin degradation capabilities of two Pseudomonas strains isolated from activated sludge*, Journal of Hazardous Materials, 2015, Vol. 282, 158–164.
- [18] LIN C., GAN L., CHEN Z.L., *Biodegradation of naphthalene by strain Bacillus fusiformis (BFN)*, Journal of Hazardous Materials, 2010, Vol. 182, No. 1/3, 771–777.
- [19] MARCO-URREA E., PÉREZ-TRUJILLO M., BLÁNQUEZ P., VICENT T., CAMINAL G., *Biodegradation of the analgesic naproxen by Trametes versicolor and identification of intermediates using HPLC-DAD-MS and NMR*, 2010, Bioresource Technology, Vol. 101, No. 7, 2159–2166.
- [20] MELVIN S.D., *Oxidative stress, Energy storage, and swimming performance of Limnodynastes peronii tadpoles exposed to a sub-lethal pharmaceutical mixture throughout development*, Chemosphere, 2015, doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.09.034.
- [21] NESBITT R., *Effects of chronic exposure to ibuprofen and naproxen on Florida flagfish (Jordanella floridae) over one complete life-cycle*, Master of Science in Applied Bioscience, University of Ontario Institute of technology, Oshawa 2011, 1–153.
- [22] PARROT J., BENNIE D.T., *Life-cycle exposure of Fathead minnows to a mixture of six common pharmaceuticals and triclosan*, Journal of Toxicology and Environmental Health, 2009, Vol. 72, No. 10, 633–641.
- [23] QUINN B., GAGNE F., BLAISE C., *An investigation into the acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals (and their solvents) found in wastewater effluent on the cnidarian, Hydra attenuate*, Science of the Total Environment, 2008, Vol. 389, No. 3, 306–314.
- [24] QUINTANA J.B., WEISS S., REEMTSMA T., *Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by membrane bioreactor*, Water Research, 2005, Vol. 39, No. 12, 2654–2664.
- [25] RODARTE-MORALES A.I., FEIJOO G., MOREIRA M.T., LEMA M.J., *Biotransformation of three pharmaceutical active compounds by the fungus Phanerochaete chrysosporium in a fed batch stirred reactor under air and oxygen supply*, Biodegradation, 2012, Vol. 23, No. 1, 145–156.
- [26] RODARTE-MORALES A.I., FEIJOO G., MOREIRA M.T., LEMA M.J., *Degradation of selected pharmaceutical and personal care products (PPCPs) by white-rot fungi*, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, Vol. 27, No. 8, 1839–1846.
- [27] ROE J.H., *The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent*, The Journal of Biological Chemistry, 1955, Vol. 212, No. 1, 335–343.
- [28] SAGRISTA E., LARSSON E., EZODDIN M., HIDALGO M., SALVADO V., JONSSON J.A., *Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in sewage sludge by direct hollow fiber supported liquid membrane extraction and liquid chromatography-mass spectrometry*, Journal of Chromatography A, 2010, Vol. 1217, No. 40, 6153–6158.
- [29] SCHMIDT S., SCOW K., ALEXANDER M., *Kinetocs of p-nitrophenol mineralization by a Pseudomonas sp. Effects of second substrates*, Applied and Environmental Microbiology, 1987, Vol. 53, No. 11, 2617–2623.
- [30] SEGURA A., DUQUE E., MOSQUEDA G., RAMOS J.L., JUNKER F., *Multiple responses of Gram-negative bacteria to organic solvents*, Environmental Microbiology, 1999, Vol. 1, No. 3, 191–198.

- [31] SINGH S., SINGH B.B., CHANDRA R., PATEL D.K., RAI V., *Synergistic biodegradation of pentachlorophenol by Bacillus cereus (DQ002384), Serratia marcescens (AY927692) and Serratia marcescens (DQ002385)*, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009, Vol. 25, No. 10, 1821–1828.
- [32] TERNES T., *Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers*, Water Research, 1998, Vol. 32, No. 11, 3245–3260.
- [33] WOJCIESZYŃSKA D., DOMARADZKA D., HUPERT-KOCUREK K., GUZIK U., *Bacterial degradation of naproxen – undisclosed pollutant in the environment*, Journal of Environmental Management, 2014, Vol. 145, 157–161.
- [34] WOJEWODA ŚLĄSKI, WOJEWÓDZKI INSPEKTORAT OCHRONY ŚRODOWISKA W KATOWICACH, *Centralne składowisko odpadów „Rudna Góra”, zakłady Chemiczne „organika Azot” SA w Jaworznie*, [w:] Ocena stanu środowiska w rejonie obiektów objętych monitoringiem lokalnym, na terenie województwa śląskiego, Katowice 2012, 43–46.
- [35] ZHENG B., ZHENG Z., ZHANG J., LIU Q. WANG J., LUO X., WANG L., *Degradation kinetics and by-products of naproxen in aqueous solutions by gamma irradiation*, Environmental Engineering Science, 2012, Vol. 29, No. 6, 386–391.
- [36] ZHONG Z.D.F., SUN L.L., HUANG H.H., *Microbial transformation of naproxen by Cunninghamella species*, 2003, Acta Pharmacologica Sinica, Vol. 24, No. 5, 442–447.
- [37] ZHUANG W.Q., TAY J.H., MASZENAN A.M., KRUMHOLZ L.R., TAY S.T.L., *Importance of Gram-positive naphthalene-degrading bacteria in oil-contaminated tropical marine sediments*, Letters in Applied Microbiology, 2003, Vol. 36, No. 4, 25–257.

#### NAPROXEN – THE HARD DEGRADE NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUG AND ITS BIOTRANSFORMATION BY *BACILLUS* SP. B1(2015B)

Isolated *Bacillus* sp. B1(2015b) completely biotransforms 6,0 mg/l of naproxen. Naproxen was transformed in 24 % in mono-substrate conditions during 35 days. Naproxen was not sufficient carbon and energy source for *Bacillus* sp. B1(2015b) strain because culture optical density decrease was observed. Whereas naproxen biotransformation was complete in cometabolic conditions with glucose and culture growth was noticed. In addition *O*-desmethylnaproxen was identified as one of naproxen's metabolites. *O*-desmethylnaproxen concentration was decreased and another metabolites was disappeared since 29 day of experiment.. This fact suggests that naproxen is completely degraded.