



Doctoral Thesis

Characterization of ozone-based oxidative treatment as a means of eliminating the target-specific biological activities of municipal wastewater-borne antibacterial compounds

Author(s):

Dodd, Michael C.

Publication Date:

2008

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005706450> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 17934

Characterization of Ozone-Based Oxidative Treatment as a Means of Eliminating the Target-Specific Biological Activities of Municipal Wastewater-Borne Antibacterial Compounds

A Dissertation Submitted to
ETH ZURICH
for the degree of Doctor of Sciences

presented by
MICHAEL CAMERON DODD
Bachelor of Science, Civil Engineering - Georgia Institute of Technology, 2001
Master of Science, Environmental Engineering - Georgia Institute of Technology, 2003
born on May 14, 1978
citizen of the United States of America

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. René P. Schwarzenbach, examiner
Prof. Dr. Urs von Gunten, co-examiner
Dr. Hans-Peter E. Kohler, co-examiner
Prof. Dr. Clemens von Sonntag, co-examiner

Zurich 2008

Summary

The reactions of ozone (O_3) and hydroxyl radical ($\cdot OH$) with each of fourteen clinical-use antibacterial compounds (from nine different structural families) and one general-use, non-clinical antibacterial compound (i.e., the biocide triclosan, or TRI) that are frequently detected in municipal wastewaters were characterized by a wide array of chemical and microbiological analytical techniques, to determine: (a) the kinetics of model compound oxidation by O_3 and $\cdot OH$ - via measurement of second-order rate constants for each reaction, at various pH conditions, (b) at which specific structural moieties within the antibacterial compounds direct reactions with O_3 take place, and how these reaction sites correlate with structural moieties known to play a role in each antibacterial class' target-specific modes of antibacterial activity, (c) whether reactions with each oxidant result in elimination of the parent antibacterial compounds' biological activities, (d) if not, the identities and relative potencies of transformation products generated during reaction with either O_3 or $\cdot OH$ that retain appreciable antibacterial activity, (e) the kinetics with which such biologically-active products are oxidized by O_3 and $\cdot OH$, and (f) ultimately, whether application of O_3 -based oxidative treatment to municipal wastewater matrixes will be likely to result in rapid, efficient elimination of the antibacterial activities of the model compounds investigated here, as well as of structurally-analogous compounds from the same antibacterial structural classes.

In the first portion of this work, kinetics investigations demonstrated that each of the model clinical-use antibacterial compounds are oxidized by O_3 with apparent second-order rate constants, $k_{O_3,app}'' > 1 \times 10^3 M^{-1}s^{-1}$, at pH 7, with the exception of *N*(4)-acetyl-sulfamethoxazole, for which $k_{O_3,app}''$ is $2.5 \times 10^2 M^{-1}s^{-1}$. $k_{O_3,app}''$ (pH 7) for macrolides, sulfamethoxazole, trimethoprim, tetracycline, vancomycin, and amikacin appear to correspond directly to oxidation of biochemically essential moieties. Initial reactions of O_3 with *N*(4)-acetylsulfamethoxazole, fluoroquinolones, lincomycin, and β -lactams do not lead to appreciable oxidation of biochemically essential moieties, although O_3 does attack such moieties within the fluoroquinolones and lincomycin via slower secondary reactions. During ozonation of a sample of secondary municipal wastewater effluent, measured losses were dependent on $k_{O_3,app}''$, but independent of $k_{\cdot OH,app}''$. O_3 doses ≥ 3 mg/L yielded $\geq 99\%$ depletion of fast-reacting substrates ($k_{O_3,app}'' > 5 \times 10^4 M^{-1}s^{-1}$). Ten substrates reacted predominantly

with O₃; only four were oxidized predominantly by [•]OH. These results indicate that many antibacterial compounds will be oxidized in wastewater via selective reactions with O₃.

In the second part of this work, oxidation of TRI by O₃ was investigated to determine reaction kinetics, reaction site(s), and consequent changes in TRI's antibacterial activity. TRI was found to react very rapidly with O₃ at circumneutral pH (i.e., $k_{O_3,app}'' = 3.8 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ at pH 7). The observed positive dependence of $k_{O_3,app}''$ on pH, comparison of TRI reactivity toward O₃ with that of other phenolic model compounds, and correlation of the elementary k_{O_3} values for neutral and anionic TRI to phenol ring substituent effects (via Brown-Okamoto correlation with other substituted phenols), are all consistent with electrophilic attack by O₃ at the TRI phenol ring. Biological assay of O₃-treated TRI solutions indicated that reaction with O₃ yields efficient elimination of TRI's antibacterial activity. TRI oxidation was also investigated during ozonation of effluent samples from two conventional wastewater treatment plants. Nearly 100% TRI depletion was achieved for a 4 mg/L ($8.3 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$) O₃ dose applied to a wastewater containing 7.5 mg/L of DOC, and ~58% TRI depletion for dosage of 6 mg/L ($1.3 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$) O₃ to a wastewater containing 12.4 mg/L of DOC. At O₃ doses greater than 1 mg/L ($2.1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$), [•]OH reactions accounted for <35% of observed TRI losses in these wastewaters, indicating that TRI oxidation was due primarily to the direct TRI-O₃ reaction, which leads to deactivation of TRI.

In the third part of the investigation, microbiological assays were developed to quantify the resulting changes in antibacterial potencies during treatment of the model clinical-use antibacterial molecules investigated in the first portion of this work with increasing doses of O₃ and [•]OH, as well as during treatment of TRI with increasing [•]OH exposures. Potency measurements were determined from dose-response relationships obtained by exposing *E. coli* or *B. subtilis* reference strains to treated samples of each antibacterial compound via broth micro- or macrodilution assays, and related to the measured residual concentrations of parent antibacterial in each sample. Data obtained from these experiments show that O₃ and [•]OH reactions lead in nearly all cases to stoichiometric elimination of antibacterial activity (i.e., loss of one mole equivalent of potency per mole of parent compound consumed) for the clinical-use antibacterial compounds and for TRI. The β -lactams penicillin G (PG) and cephalixin (CP) represent the only two exceptions, as bioassay measurements indicate that the direct reaction of these two compounds with O₃ leads to formation of biologically active transformation products. Nevertheless, these data, coupled with knowledge of ozonation

process data at the pilot- and full-scale, suggest that wastewater ozonation will generally yield sufficient structural modification of the investigated antibacterial molecules to eliminate their antibacterial activities, whether oxidation results from selective reactions with O₃ or from relatively non-selective reactions with incidentally-produced •OH.

In the fourth and final component of this work, O₃ reaction kinetics and pathways were evaluated in depth for the two β-lactam antibacterial compounds - PG and CP - found to yield biologically active products upon direct reaction with O₃. PG was found to yield two major products in nearly equal yields, together accounting for approximately 100% of the parent compound consumption. These two products were purified and isolated by C₂ reversed-phase silica gel chromatography, followed by freeze-drying, and identified by extensive chromatographic, MS/MS, multi-nuclear NMR, and FT-IR analyses as the stereoisomeric (*R*)- and (*S*)-sulfoxides of PG. The former of these was determined to retain roughly 15% of the potency of the parent PG molecule, whereas the latter was functionally inactive. Each of the PG sulfoxides was determined to be recalcitrant toward further oxidation by O₃. However, the (*R*)-sulfoxide was readily transformed by •OH (with $k_{\text{OH,app}}'' = 7.4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, at pH 7), resulting in roughly quantitative elimination of its biological activity. CP was found to yield four major transformation products. These were identified after purification by C₁₈ reversed-phase silica gel chromatography and isolation via freeze-drying as the (*R*)- and (*S*)-sulfoxides of CP (formed in ~55% and ~45% yields) and two C-2/C-3 double bond cleavage products (formed in ~34% and ~18% yields); one a structural analogue of the penicilloic acid of CP - formed by intermolecular nucleophilic attack of H₂O on the electrophilic C-8 carbon of the CP β-lactam ring, and the other a 7-piperazine-8,12-dione containing rearrangement product - formed by intramolecular nucleophilic attack of the N-18 amino nitrogen on the same carbon. As in the case of PG, the (*R*)-sulfoxide of CP was found retain considerable biological activity (~85% that of the parent CP molecule), whereas each of the three other CP transformation products was determined to be functionally inactive. CP-(*R*)-sulfoxide was found to be susceptible to further oxidation by both O₃ and •OH (with $k_{\text{O}_3,\text{app}}'' = 2.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ and $k_{\text{OH,app}}'' = 7.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, at pH 7), leading to approximately quantitative elimination of antibacterial activity in each case. These results, when evaluated in the context of the reaction kinetics measured for oxidation of PG, CP, and their O₃-derived transformation products, suggest that the antibacterial activities of these representative β-lactams, as well as the

activities of many structurally-analogous penicillins and cephalosporins, should be effectively eliminated during ozonation of municipal wastewaters.

In summary, the results obtained from this investigation demonstrate that, not only are most antibacterial molecules rapidly oxidized during ozonation of municipal wastewater by selective reactions with O_3 , but that these reactions generally occur at target sites for which structural modification by O_3 results in quantitative loss of the parent antibacterial molecules' mode-specific biological activities. Furthermore, oxidation of every antibacterial molecule included in this investigation by $\cdot OH$ - which will be produced in high yield during any wastewater ozonation process - led to nearly quantitative elimination of the model antibacterials' biological activities. In the only cases for which biological activities were not eliminated via the initial reaction with O_3 - that is, for the two β -lactams PG and CP - the biologically active (*R*)-sulfoxide products formed in these reactions could be further oxidized by either O_3 (CP-(*R*)-sulfoxide only) or $\cdot OH$ (both CP-(*R*)-sulfoxide and PG-(*R*)-sulfoxide) to inactive products. These findings, when taken into consideration with additional operational data obtained here and in other investigations of municipal wastewater ozonation, suggest that effectively complete deactivation of nearly every major antibacterial structural class will be achieved at the 5-10 mg/L O_3 doses typically required to achieve close to 100% depletion of such antibacterial molecules in such matrixes. This in turn leads to the more general conclusion that wastewater ozonation can now be expected to provide a robust, relatively efficient barrier to discharge of biologically-active antibacterial compounds - which are, outside of steroid hormones, one of the most potent biologically-active sub-classes of micropollutants known to be present in wastewaters.

Zusammenfassung

Die Reaktionen von Ozon (O_3) und Hydroxylradikalen ($\cdot OH$) mit vierzehn in klinischen Anwendungen eingesetzten Antibiotika aus neun verschiedenen Substanzklassen sowie einem breit verwendeten Biozid (Triclosan oder TRI), welche häufig in Kläranlagenabwässern nachgewiesen werden, wurden mit einer Vielzahl von chemischen und mikrobiologischen Methoden unter folgenden Aspekten untersucht: (a) Bestimmung der Kinetik von antibakteriellen Modellsubstanzen bei der Oxidation durch O_3 und $\cdot OH$ mittels Messung der Zweitordnungs-Geschwindigkeitskonstanten unter verschiedenen pH-Bedingungen; (b) Bestimmung des spezifischen Angriffspunkts von O_3 bei den jeweiligen Modellsubstanzen und Vergleich dieser Stellen mit funktionellen Gruppen, welche für ihre antibakterielle Aktivität bekannt sind; (c) demzufolge Untersuchung, ob Reaktionen mit O_3 oder $\cdot OH$ zur Eliminierung der antibakteriellen Aktivität der Modellsubstanzen führen, und (d) – falls dies nicht der Fall ist - Identifikation und Bestimmung der antibakteriellen Potenz von bioaktiven Umwandlungsprodukten, welche durch Reaktionen mit O_3 oder $\cdot OH$ gebildet wurden, sowie (e) Bestimmung der Kinetik von solchen bioaktiven Produkten in Reaktionen mit O_3 und $\cdot OH$ und (f) schliesslich Evaluation, ob die Verwendung von ozonbasierten Oxidationsverfahren in der Abwasserreinigung rasch und effizient zu einer Elimination der antibakteriellen Aktivität der untersuchten Modellsubstanzen sowie strukturähnlicher Stoffe derselben Substanzklassen führen kann.

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten antibakteriellen Modellsubstanzen aus klinischen Anwendungen bei pH 7 durch Ozon mit scheinbaren Zweitordnungs-Geschwindigkeitskonstanten $k_{O_3,app}''$ grösser als $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ oxidiert wurden, ausser *N*(4)-Acetylsulfamethoxazol, welches ein $k_{O_3,app}''$ von $2.5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ aufwies. Die Geschwindigkeitskonstanten $k_{O_3,app}''$ (pH 7) für Makrolide, Sulfonamide, Trimethoprim, Tetracycline, Vancomycin und Amikacin scheinen direkt mit der Oxidation der jeweiligen biochemisch aktiven Struktur im Molekül zu korrelieren. Bei *N*(4)-Acetylsulfamethoxazol, Fluoroquinolonen, Lincomycin und β -Lactamen hingegen führten die Initialreaktionen von O_3 nicht zu einer wesentlichen Oxidation solcher aktiven Strukturen, obwohl O_3 diese Stellen in langsameren Sekundärreaktionen angreifen kann. Die Elimination der untersuchten Substanzen während der Ozonung einer Probe aus dem sekundären Kläranlagenablauf hing von $k_{O_3,app}''$ ab, war aber unabhängig von $k_{OH,app}''$. Ozondosen $\geq 3 \text{ mg/L}$ führten zu einem ≥ 99 -prozentigen Abbau von schnell reagierenden Modellsubstanzen

($k_{O_3,app}'' > 5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Zehn Modellsubstanzen wurden hauptsächlich durch O_3 oxidiert, während lediglich vier Substanzen vorwiegend mit $\cdot OH$ reagierten. Aufgrund dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass viele antibakterielle Substanzen im Abwasser durch selektive Reaktionen mit O_3 oxidiert werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Oxidation von TRI durch O_3 erforscht, um die Reaktionskinetik, reaktive Stellen im Molekül und nachfolgende Veränderungen der Bioaktivität von TRI zu bestimmen. Es konnte gezeigt werden, dass TRI bei neutralen pH-Bedingungen sehr schnell mit O_3 reagiert ($k_{O_3,app}'' = 3.8 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ bei pH 7). Die beobachtete pH-Abhängigkeit von $k_{O_3,app}''$, der Vergleich der O_3 -Reaktivität von TRI mit anderen phenolischen Molekülen sowie die Korrelation der spezifischen k_{O_3} -Werte von neutralem und anionischem TRI mit Substitutionseffekten am Phenolring (via Brown-Okamoto-Korrelation mit anderen substituierten Phenolen) deuten alle auf einen elektrophilen Angriff von O_3 auf den TRI-Phenolring hin. Mikrobiologische Untersuchungen zeigten ferner, dass die Reaktion von TRI mit O_3 zu einer effizienten Elimination der Bioaktivität von TRI führt. Daneben wurde auch die Oxidation von TRI während der Ozonung von Abwasserproben, welche aus dem Ablauf von zwei verschiedenen Kläranlagen entnommen wurden, untersucht. Im einen Ablauf mit 7.5 mg/L DOC wurde bei einer O_3 -Dosis von 4 mg/L ($8.3 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$) ein beinahe 100-prozentiger TRI-Abbau beobachtet, während ungefähr 58% TRI-Abbau beim anderen Ablauf mit 12.4 mg/L DOC und einer O_3 -Dosis von 6 mg/L ($1.3 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$) erzielt wurden. Bei O_3 -Dosen $\geq 1 \text{ mg/L}$ ($2.1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$) trugen Reaktionen mit $\cdot OH$ weniger als 35% zum gemessenen TRI-Abbau in diesen Abwässern bei. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Oxidation und entsprechend auch Deaktivierung von TRI hauptsächlich auf direkte Reaktionen mit O_3 zurückzuführen sind.

Im dritten Teil dieser Studie wurden mikrobiologische Methoden entwickelt, um Veränderungen der antibakteriellen Potenz der klinischen Modellsubstanzen aus dem ersten Teil dieser Arbeit in Abhängigkeit von O_3 - und $\cdot OH$ -Exposition sowie Veränderungen der Bioaktivität von TRI mit steigenden $\cdot OH$ -Expositionen zu quantifizieren. Als Grundlage für die Potenzmessungen dienten Dosis-Wirkungsbeziehungen, welche durch Exposition von Referenzstämmen (*E. coli* oder *B. subtilis*) mit oxidierten Lösungen der jeweiligen Modellsubstanzen erstellt und mit der Restkonzentration des Wirkstoffes in der Probe korreliert wurden. Diese Versuche ergaben in nahezu allen Fällen eine stöchiometrische Elimination der antibakteriellen Aktivität (d.h. Verlust von einem Mol-Äquivalent Potenz

beim gleichzeitigen Verlust von einem Mol Substanz) bei Reaktionen von O₃ und [•]OH mit klinischen Antibiotika und TRI. Die β-Lactame Penicillin G (PG) und Cephalexin (CP) bildeten die einzigen Ausnahmen, da die direkte Reaktion von O₃ mit diesen zwei Molekülen zur Bildung von bioaktiven Umwandlungsprodukten führte. Dennoch lassen diese Daten – in Kombination mit dem Prozessverständnis von Ozonreaktoren in Pilot- und Grossanlagen – den Schluss zu, dass die Ozonung von Abwässern im allgemeinen genügend strukturelle Veränderungen an den untersuchten Modellsubstanzen hervorrufen wird, um deren antibakterielle Wirkung zu eliminieren. Dabei spielt es keine Rolle, ob die Oxidation hauptsächlich durch selektive Reaktionen mit O₃ oder vergleichbar unselektiven Reaktionen mit [•]OH zustande kommt.

Im vierten und letzten Teil dieser Studie wurden die Kinetik sowie Reaktionspfade für die Reaktion von O₃ mit den zwei β-Lactamen PG und CP, welche zu teils bioaktiven Umwandlungsprodukten oxidiert werden, detailliert untersucht. Die Oxidation von PG ergab zwei Hauptprodukte, welche zu ungefähr gleichen Anteilen zusammen knapp 100% des beobachteten Abbaus der Muttersubstanz ausmachen. Diese zwei Produkte wurden per C₂ Reversed-phase-Chromatographie gefolgt von Gefriertrocknung gereinigt und isoliert. Mit Hilfe verschiedener analytischer Verfahren (chromatographische Analysen, MS/MS, ¹H-, ¹³C-, und ¹⁵N-NMR, sowie FT-IR Analysen) konnten die Produkte als die (*R*)- und (*S*)-Stereoisomere der PG-Sulfoxide identifiziert werden. Das PG-(*R*)-Sulfoxid behielt noch ~15% der Potenz der Muttersubstanz PG, während das PG-(*S*)-Sulfoxid als funktionell inaktiv befunden wurde. Die beiden PG-Sulfoxide reagierten nicht weiter mit O₃, jedoch konnte das PG-(*R*)-Sulfoxid rasch mit [•]OH abgebaut ($k_{\text{OH,app}}^{\text{PG-(R)SO}} = 7.4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, bei pH 7) und somit annähernd quantitativ deaktiviert werden. Im Falle von CP wurden vier verschiedene Oxidationsprodukte identifiziert. Diese wurden per C₁₈ Reversed-phase-Chromatographie gefolgt von Gefriertrocknung gereinigt und isoliert. Die anschliessenden Analysen ergaben für die CP-Produkte zwei CP-(*R*)- und (*S*)-Sulfoxide (in ~55% and ~45% Ertrag) und zwei Spaltungsprodukte der C-2/C-3-Doppelbindung (in ~34% and ~18% Ertrag). Von den letzteren beiden wurde das eine Spaltungsprodukt als ein Strukturanalog von CP-Penicilloinsäure identifiziert, welches durch einen intermolekularen nukleophilen Angriff von H₂O auf den elektrophilen C-8 Kohlenstoff des β-Lactamringes gebildet wurde, während das andere Spaltungsprodukt 7-Piperazine-8,12-dion enthielt, gebildet durch einen intramolekularen nukleophilen Angriff des N-18 Amino-Stickstoffes auf denselben Kohlenstoff. Wie im Fall von PG konnte gezeigt werden, dass das (*R*)-Sulfoxid von CP eine

erhebliche antibakterielle Aktivität behielt (~85% der CP-Muttersubstanz), während die drei anderen Produkte grundsätzlich inaktiv waren. Das CP-(*R*)-Sulfoxid konnte sowohl mit O₃ als auch [•]OH weiter oxidiert werden (mit $k_{O_3,app}'' = 2.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und $k_{\cdot OH,app}'' = 7.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, bei pH 7), was in beiden Fällen zu einer ungefähr quantitativen Eliminierung der antibakteriellen Aktivität führte. Diese Ergebnisse zeigen, dass die antibakterielle Aktivität von den repräsentativen β -Lactamen PG und CP sowie von vielen anderen strukturähnlichen Penicillinen und Cephalosporinen während der Ozonung von Abwässern weitgehend eliminiert werden sollte.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass die meisten antibakteriellen Stoffe während der Ozonung von Abwasser durch selektive Reaktionen mit O₃ nicht nur oxidiert, sondern auch soweit umgewandelt werden, dass sie schliesslich biologisch inaktiv sind. Darüber hinaus führte auch die Reaktion mit [•]OH – welche bei der Ozonung von Abwasser mit hoher Ausbeute gebildet werden – zu einer nahezu quantitativen Deaktivierung der untersuchten Substanzen. In den beiden einzigen Fällen, bei welchen die antibakterielle Wirkung nicht direkt durch Initialreaktionen mit O₃ eliminiert wurde - nämlich bei den β -Lactamen PG und CP, sind die bioaktiven Produkte trotzdem per O₃ (im Falle des CP-(*R*)-Sulfoxids) oder [•]OH (CP-(*R*)-Sulfoxid and PG-(*R*)-Sulfoxid) leicht deaktivierbar. Unter Berücksichtigung von zusätzlichen Prozessdaten aus dieser und anderen Studien über die Ozonung von Abwasser kann davon ausgegangen werden, dass bei O₃-Dosen von 5-10 mg/L, welche typischerweise für einen nahezu vollständigen Abbau der Muttersubstanzen gebraucht werden, eine komplette Deaktivierung von fast allen antibakteriellen Substanzklassen erreicht wird. Somit stellt die Ozonung eine zuverlässige und effiziente Barriere zur Elimination von bioaktiven antibakteriellen Substanzen aus Abwässern dar.