

**Mikrobiologia
oraz metody analityczne
w nauce**

Mikrobiologia oraz metody analityczne w nauce

Redakcja:
Kinga Kropiwiec
Mirosław Szala

Lublin 2016

Recenzenci:

- Prof. dr hab. Anna Malm
- Dr hab. Grażyna Żukowska
- Dr Anna Berecka
- Dr Elżbieta Kochanowicz
- Dr Mariola Janiszewska
- Dr Anna Szafranek-Nakonieczna
- Dr Anna Pytlak
- Dr Agnieszka Kuźniar
- Dr Barbara Chudzik
- Dr Agnieszka Nawrocka
- Dr Jan Sobczyński
- Dr Przemysław Grela
- Dr Beata Król
- Dr Magdalena Jaszek

Wszystkie opublikowane rozdziały otrzymały pozytywne recenzje.

Skład i łamanie:

Ilona Żuchowska

Projekt okładki:

© Copyright by Wydawnictwo Naukowe TYGIEL Sp. z o.o.

ISBN 978-83-65598-27-1

Wydawca:

Wydawnictwo TYGIEL

ul. Głowackiego 35/341, 20-060 Lublin

www.wydawnictwo-tygiel.pl

Spis treści

| | |
|--|-----|
| <i>Katarzyna Grata</i> Aktywność biologiczna <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> wobec <i>Fusarium</i> spp. wyzolowanych z pędów szparaga (<i>Asparagus officinalis</i> L.)..... | 7 |
| <i>Urszula Kotowska, Justyna Kapelewska, Joanna Karpińska</i> Analiza LZO emitowanych z odcieków składowiskowych techniką HS-SPME/GC-MS | 23 |
| <i>Jakub Nowak, Dorota Nowak, Mariusz Trzcziński</i> Badania koralowca bambusowego metodą spektroskopii fotoelektronów | 37 |
| <i>Katarzyna Czerewko</i> Biofilm – niezwykła społeczność mikroorganizmów | 50 |
| <i>Aleksandra Aniołek</i> Ektoina jako substancja osmoregulacyjna występująca u organizmów metanotroficznych | 61 |
| <i>Anna Gałązka, Rafał Gałązka</i> Fitoremediacja gleb skażonych chemicznie | 70 |
| <i>Arkadiusz Goede, Maciej Gawroński, Kinga Gutowska</i> Metoda High Resolution Melting Analysis i jej potencjalne zastosowania w biomedycynie..... | 84 |
| <i>Anna Gałązka, Rafał Gałązka</i> Mykoryza w biodegradacji | 96 |
| <i>Roman Adamczyk, Mateusz Cholewiński, Joanna Wilk, Wojciech Baran, Ewa Adamek</i> Ocena ekotoksyczności produktów degradacji metodą Fentona antybiotyków weterynaryjnych | 106 |
| <i>Krzysztof Jakubczak, Michał Kania, Tomasz Zawila, Robert D. Wojtyczka, Tomasz J. Wąsik</i> Ocena wrażliwości na antybiotyki aminoglikozydowe i ryfampicynę szczepów <i>Staphylococcus epidermidis</i> tworzących i nietworzących biofilmu | 126 |
| <i>Agnieszka Borsuk, Paweł Wiczling</i> Podejście populacyjne do modelowania farmakokinetyki leków | 142 |

| | |
|--|-----|
| <i>Beata Kuczyńska, Weronika Serafin, Kamila Puppel</i> Próba zastosowania ekstraktu z <i>Echinacea purpurea</i> w zwalczaniu bakterii patogennych wywołujących <i>mastitis</i> u krów | 167 |
| <i>Natalia Skubij</i> Tymianek pospolity – wartościowa roślina przyprawowa, lecznicza i olejkodajna. Praca przeglądowa | 177 |
| <i>Magdalena Paczkowska, Judyta Cielecka-Piontek</i> Układy dostarczania antybiotyków jako efektywna i bezpieczna alternatywa dla farmakoterapii ciężkich zakażeń bakteryjnych | 186 |
| <i>Krzysztof Jędrzejewski, Jan Fiedurek, Paweł Rusinek, Mateusz Kutyla</i> Wpływ stresu oksydacyjnego na biotransformację β -pinenu przy użyciu psychrotroficznego grzyba <i>Chrysosporium pannorum</i> | 197 |
| <i>Karolina Jakubczyk, Katarzyna Barchiewicz, Gabriela Dyrda</i> Wpływ wybranych ftalocyjanin na komórki drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 214 |
| <i>Daniel Radzikowski</i> Wpływ wybranych miktokosyn na zdrowie zwierząt i sposoby ich eliminacji z pasz | 229 |
| <i>Piotr Nowaczyk, Kamila Korzekwa</i> Zakażenia mikrobiologiczne produktów kosmetycznych | 237 |
| <i>Paweł Tyczka, Maciej Masłyk, Konrad Kubiński</i> Zastosowanie filtracji żelowej do określania mechanizmu działania inhibitora na kinazę, na przykładzie pochodnej benzimidazolu i nietypowej kinazy Rio1 | 249 |
| Indeks autorów | 259 |

Aktywność biologiczna *Bacillus amyloliquefaciens* wobec *Fusarium* spp. wyizolowanych z pędów szparaga (*Asparagus officinalis* L.)

1. Wstęp

Szparagi uprawiane są na świecie na łącznym obszarze 168,12 tys. ha, a największe obszary produkcyjne znajdują się w Chinach, Niemczech, Meksyku oraz Peru. W Polsce powierzchnię upraw szacuje się na 1,6-2,0 tys. ha. Z roku na rok areał upraw szparaga i jego spożycie w naszym kraju systematycznie wzrasta, z uwagi na jego właściwości odżywcze i lecznicze. Jednak ponad połowa polskich szparagów jest eksportowana głównie do Niemiec, a reszta do Holandii, Francji czy Belgii [1, 2]. Wieloletni charakter uprawy szparaga (10-15 lat) powoduje, że porażenia przez grzyby odglebowe, szczególnie *Fusarium* spp. mogą być powodem strat w ich uprawie. Grzyby te atakują rośliny uprawne i ozdobne we wszystkich fazach rozwojowych. Powodują objawy chorobowe w postaci fuzaryjnego więdnienia oraz zgnilizny różnych organów roślin, zgorzeli siewek i łodyg [2-5]. Najgroźniejszą chorobą szparaga jest zgnilizna korzeni i podstaw pędów tzw. fuzarioza, której źródłem infekcji mogą być porażone nasiona, karpki a także gleba [2, 6-10]. Rośliny szparaga atakowane są najczęściej m.in. przez: *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. proliferatum*, *F. redolens*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* [2, 7-14]. Częstotliwość występowania tych grzybów a tym samym symptomów porażenia zależy głównie od warunków klimatycznych, pory roku, stosowanych zabiegów agrotechnicznych, jak również zróżnicowania podatności odmian szparagów [2, 9, 10, 12, 15-19].

Przy wieloletniej uprawie szparaga, których głębokość ukorzenienia się wynosi więcej niż 1 m, chemiczne zwalczanie fuzariozy jest utrudnione lub wręcz niemożliwe [2]. Wprawdzie w literaturze można znaleźć próby opracowania metod redukcji występowania tej choroby to jednakże uzyskiwane rezultaty nie są długotrwałe i w pełni zadowalające [11, 16, 17, 20, 21]. Aktualnie metody ochrony szparagów przed chorobami polegają na uprawach odmian tolerancyjnych na wybrane agrofagi i profilaktycznych metodach agrotechnicznych [22]. W ostatnich latach na całym świecie,

¹ kgrata@uni.opole.pl, Samodzielna Katedra Biotechnologii i Biologii Molekularnej, Wydział Przyrodniczo-Techniczny, Uniwersytet Opolski, www.uni.opole.pl

można zaobserwować wzmożone zainteresowanie metodami naturalnymi wykorzystującymi potencjał mikroorganizmów zaliczanych do grupy PGPR (ang. plant growth promoting rhizobacteria) [17, 23-25]. Wśród nich najliczniejszą grupę stanowią bakterie rodzajów *Pseudomonas* oraz *Bacillus*. Na szczególną uwagę zasługują tlenowe bakterie *B. subtilis* i *B. amyloliquefaciens* z uwagi na zdolność szybkiej penetracji środowiska, zdolność wytwarzania przetrwalników oraz aktywność metaboliczną. Ponadto większość z nich stanowią gatunki bezpieczne dla ludzi i zwierząt (posiadają status GRAS, z ang. Generally Recognized As Safe) [21, 25, 26]. Każda z tych bakterii może wytwarzać nawet do kilku rodzajów metabolitów, których spektrum i stopień oddziaływania na grzyby jest cechą szczepową (tabela 1).

Tabela 1. Grzyby pleśniowe wrażliwe na metabolity wytwarzane przez *B. amyloliquefaciens* i *B. subtilis*

| Gatunki grzybów | Literatura |
|--|--------------|
| <i>Rhizoctonia solani</i> | [27] |
| <i>Botrytis cinerea</i> | [28] |
| <i>Fusarium oxysporum</i> (różne szczepy), | [27, 29-33] |
| <i>Fusarium solani</i> | [34] |
| <i>Fusarium culmorum</i> | [35] |
| <i>Fusarium graminearum</i> | [28, 30, 35] |
| <i>Fusarium moniliforme</i> | [30] |
| <i>Aspergillus niger</i> | [29, 30] |
| <i>Aspergillus clavatus</i> | [29] |
| <i>Aspergillus flavus</i> | [30] |
| <i>Sclerotinia sclerotinum</i> | [25] |

Cechy te sprawiają, że bakterie z rodzaju *Bacillus* są obiektem wielu badań prowadzonych na całym świecie w kierunku dokładnego poznania ich właściwości, poszukiwania wśród nich nowych szczepów o szerokim spektrum działania a tym samym możliwości potencjalnego wykorzystania jako czynników biologicznej ochrony roślin.

2. Cel pracy

Celem przeprowadzonych badań była ocena *in vitro* właściwości przeciugrzybowych *Bacillus amyloliquefaciens* wobec *Fusarium proliferatum* i *Fusarium oxysporum* wyizolowanych z pędów bielonego szparaga odmiany Grolim.

3. Materiały i metody

W badaniach wykorzystano grzyby *Fusarium oxysporum* i *Fusarium proliferatum* wyizolowane z pędów bielonego szparaga oraz bakterię *Bacillus amyloliquefaciens* wyizolowaną z gleby. Pierwszym etapem badań

była izolacja grzybów z pędów szparaga, które najpierw oczyszczono powierzchniowo pod bieżącą wodą a następnie sterylnym skalpelem w miejscu zmian chorobowych pobierano 5 mm wycinki. Dezynfekowano je przez zanurzenie na 30 sekund w rozcieńczonym roztworze ACE w stosunku 1:4. Po upływie czasu wycinki przepłukiwano kilkakrotnie sterylną wodą destylowaną i osuszono w sterylnej bibule. Materiał wykładano po 3 sztuki na podłoża glukozowo ziemniaczane PDA oraz Sabourauda z chloramfenikolem. Hodowlę prowadzono przez 5-7 dni w temperaturze $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Na podstawie obserwacji makro- i mikroskopowych oraz kluczy diagnostycznych dokonano identyfikacji grzybów [36, 37]. Wyzolowane grzyby przechowywano na skosach PDA w temperaturze 4°C .

W drugim etapie badań oceniono aktywność przeciwgrzybową *Bacillus amyloliquefaciens* wobec *F. proliferatum* i *F. oxysporum* w ograniczaniu: zdolności kiełkowania zarodników, wzrostu liniowego grzybni i tempa wzrostu grzybni.

W badaniach uwzględniono:

- gęstość hodowli bakterii, którą określono spektrofotometrycznie przy długości fali 560 nm: OD560 1,0 (E=1,0) i OD560 2,0 (E=2,0),
- wiek hodowli bakterii: hodowle bulionowe prowadzone w temp. $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ przez 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, z których pozyskano supernatany poprzez odwirowanie przy 10 000 obrotach przez 15 min,
- rodzaj podłoża hodowlanego: pożywka PDA oraz szparagowa przygotowana na bazie wyciągu z szparagów odmiany Grolim.

4. Wpływ supernatantów na zdolność kiełkowania zarodników grzybów

Ocenę przeprowadzono metodą mikroskopową, w której zastosowano stężenie zarodników grzybów $1,5-3,5 \times 10^6$ w 1ml. Następnie na szkiełko przedmiotowe nanoszono po 30 μl odpowiednich supernatantów *B. amyloliquefaciens* i zarodników badanych grzybów. Inkubację prowadzono w wilgotnej, sterylnej komorze przez 20 h w temp. $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Po tym czasie dokonano liczenia zarodników grzybów i zróżnicowania stopnia ich kiełkowania. W oparciu o 4-stopniową skalę kiełkowania zarodników obliczono indeks kiełkowania zarodników (IKZ) [38]:

$$IKZ(\%) = \frac{\sum(n \cdot a)}{N \cdot 4 \cdot 100} \quad (1)$$

gdzie: n – ilość zarodników kiełkujących w danym stopniu, a – stopień skali (0- konidia nie kiełkują, 1 – strzępka rostkowa krótsza niż długość zarodnika, 2 – strzępka rostkowa równa długości zarodnika, 3 – strzępka

rostkowa 2 razy dłuższa niż długość zarodnika, 4 – strzępka rostkowa rozgałęziona i wielokrotnie dłuższa od długości zarodnika), N – ogólna liczba analizowanych mikroskopowo zarodników, 4 – najwyższy stopień skali.

5. Wpływ supernatantów na zdolność wzrostu kolonii testowanych grzybów

Na podłożach PDA i szparagowym, na których przeprowadzono supernatany z odpowiednich hodowli *Bacillus amyloliquefaciens*, umieszczano centralnie grzybnią do podłoża krążki 5 dniowej grzybni o średnicy 7,0 mm. Kontrolę stanowiły szalki zawierające bulion zamiast supernatantów. Hodowle prowadzono w temperaturze $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ dokonując pomiarów średnicy grzybni w dwóch prostopadłych do siebie liniach, w odstępach 1-2 dniowych przez 12 dni. Na podstawie uzyskanych wyników obliczono indeks tempa wzrostu liniowego testowanych grzybów (ITW) posługując się wzorem [39]:

$$ITW = \frac{A}{D} + \frac{b_1}{d_1} + \dots + \frac{b_x}{d_x} \quad (2)$$

gdzie: A – średnia z pomiarów średnicy kolonii grzyba (mm), D – czas trwania doświadczenia (dni), $b_1 \dots b_x$ – przyrost średnicy kolonii (mm), $d_1 \dots d_x$ – liczba dni od ostatniego pomiaru.

Fungistatyczną aktywność bakterii oceniono na podstawie zahamowania kiełkowania zarodników oraz zahamowania wzrostu kolonii grzybów (%) w porównaniu do próby kontrolnej (K). Doświadczenie przeprowadzono w 4 powtórzeniach a uzyskane wyniki poddano obliczeniom statystycznym metodą analizy wariancji z zastosowaniem testu Tukeya.

6. Analiza wyników

W badaniach własnych z pędów bielonego szparaga odmiany Grolim wyizolowano grzyby *Fusarium oxysporum* i *Fusarium proliferatum*. Jak podają dane literaturowe są to najczęściej izolowane grzyby z różnych odmian szparagów w Polsce i na świecie (tabela 2). Poszczególne gatunki *Fusarium* spp. atakują rośliny w określonym wieku np. *F. oxysporum* przeważnie zasiedla korzenie młodych sadzonek, podczas gdy *F. proliferatum* czy *F. redolens* wieloletnie rośliny szparagów [12].

Grzyby te mogą stanowić również zagrożenie dla człowieka z uwagi na zdolność wytwarzania mykotoksyn. Jest to cecha szczepowa i nie jest charakterystyczna dla całego gatunku. [2, 3, 8, 19, 40]. Badania Stępnia i in. [40] wykazały obecność 8 gatunków *Fusarium* należących do różnych szczepów i zdolność wytwarzania jednocześnie kilku toksyn przez jeden szczep.

Tabela 2. Grzyby z rodzaju *Fusarium* najczęściej izolowane z szparagów w Polsce i na świecie (%)

| Kraj | <i>F. oxysporum</i> | <i>F. proliferatum</i> | <i>F. solani</i> | <i>F. redolens</i> | <i>F. sporotrichoides</i> | <i>F. acuminatum</i> | <i>F. equiseti</i> | <i>F. culmorum</i> | Literatura |
|-----------------|---------------------|------------------------|------------------|--------------------|---------------------------|----------------------|--------------------|--------------------|------------|
| Niemcy | 26,6 | 5,6 | | 0,8 | | | 0,4 | | [15] |
| Hiszpania | 40,0 | 39,0 | 7,0 | 12,0 | | | | | [41] |
| Hiszpania | 27,3 | 38,2 | 29,2 | | | | | 1,8 | [13] |
| Wielka Brytania | 69,0 | 7,0 | 15,0 | 1,0 | | | | 1,0 | [41] |
| Kanada | 65,5 | 18,3 | 6,4 | 3,2 | | | | | [11] |
| Japonia | 68,0 | 28,6 | 2,5 | | | | | | [42] |
| Chiny | 22,7 | 40,9 | | | | 4,5 | 4,5 | | [19] |
| Polska | do 18,5 | do 10,0 | do 0,5 | | | | | | [12] |
| Polska | 14,0 | 37,0 | | | 27,0 | 2,0 | 11,0 | do 2,0 | [40] |
| Polska | do 42,0 | do 9,2 | do 1,0 | | | | | 2,0 | [10] |

Obecność mykotoksyn stwierdzano nie tylko w szparagach wykazujących objawy infekcji, ale również w tych bez objawów chorobowych [43]. Badania Waśkiewicz i in. [43] oraz Webera i in. [15] wykazały zdolność syntezy fumonizyn (FB1) i moniliforminy (MON) przez *F. proliferatum* i *F. oxysporum*. Stężenie ich zależało od odmiany szparaga oraz jego części i wynosiło dla FB1 0,16-152,68 µg/g oraz dla MON 15,3-585,0 µg/g [43]. Zawartość mykotoksyn w poszczególnych częściach szparaga wraz z upływem czasu ulega znacznym zmianom ilościowym [44]. Produkcję fumonizyn FB1-FB3 przez *F. proliferatum* potwierdzają również badania Wang i in. [19].

Z uwagi na porażanie szparagów przez grzyby *Fusarium* spp. i zdolność do syntezy przez nie szkodliwych mykotoksyn poszukuje się sposobów ograniczania ich występowania poprzez wykorzystanie zdolności metabolicznych bakterii, zwłaszcza z rodzaju *Bacillus*.

Wybrany do badań własnych *Bacillus amyloliquefaciens* charakteryzował się w warunkach in vitro silnym antagonizmem w stosunku do fitopatogenów szparagów z rodzaju *Fusarium*. Skuteczność tego szczepu zależała od wieku i gęstości hodowli bakteryjnej, rodzaju podłoża hodowlanego i wrażliwości grzybów. Cechy antagonistyczne bakterii wobec grzybów oceniono w oparciu o zdolność kiełkowania zarodników oraz tempo liniowego wzrostu grzybni *Fusarium* spp.. Ocena zdolności kiełkowania zarodników *F. proliferatum* wykazała najslabsze kiełkowanie

w obecności supernatantów uzyskanych hodowli *B. amyloliquefaciens* o gęstości E 2,0. Uzyskane wartości kształtowały się od 22,9 % dla 12-godzinnej hodowli bakterii do 17,2 % w przypadku 48-godzinnej hodowli i był to zarazem najniższy wynik w porównaniu do próby kontrolnej (69,2 %). Stopień redukcji zdolności kiełkowania zarodników po zastosowaniu supernatantów z hodowli o E 2,0 kształtował się od 66,9 do 75,1 %. Natomiast w obecności supernatantów pozyskanych z hodowli o gęstości E 1,0 procent kiełkujących zarodników wynosił od 25,4 dla hodowli 12-godzinnej do 29,4 w przypadku 6-godzinnej hodowli. Stopień redukcji zdolności kiełkowania był nieznacznie niższy niż w przypadku hodowli o E 2,0 i wyniósł od 57,5 do 63,3 %. Badania wykazały statystycznie wysoko istotny wpływ supernatantów pochodzących z hodowli o gęstości E 2,0 w porównaniu z hodowlą o gęstości E 1,0 i próbą kontrolną. Biorąc pod uwagę wiek hodowli wysoko istotny wpływ na zarodnikowanie grzyba wykazały supernatany pochodzące z starszych hodowli (tabela 3, wykres 1)

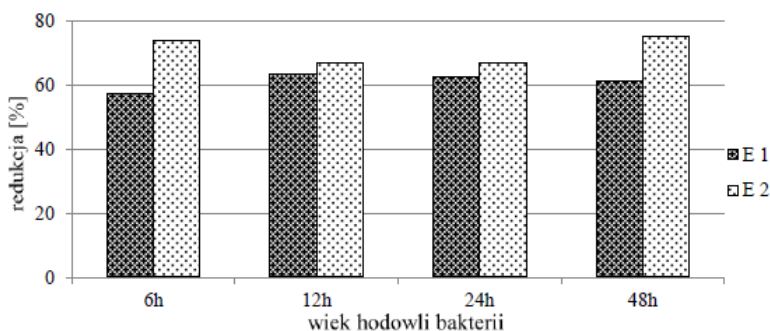
Tabela 3. Zdolność kiełkowania zarodników *F. proliferatum* i *F. oxysporum* w obecności supernatantów *B. amyloliquefaciens*

| Fusarium | Gęstość hodowli bakterii | Wiek hodowli <i>B. amyloliquefaciens</i> | | | | średnia |
|------------------------------|--------------------------|--|--------|--------|--------|---------|
| | | 6 h | 12 h | 24 h | 48 h | |
| <i>Fusarium proliferatum</i> | kontrola | 69,2 | 69,2 | 69,2 | 69,2 | 69,2 C |
| | E 1,0 | 29,4 | 25,4 | 26,0 | 27,0 | 27,0 B |
| | E 2,0 | 18,1 | 22,9 | 22,8 | 17,2 | 20,3 A |
| | średnia | 38,9 B | 39,2 B | 39,3 B | 37,8 A | |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | kontrola | 75,8 | 75,8 | 75,8 | 75,8 | 75,8 C |
| | E 1,0 | 43,7 | 34,7 | 29,8 | 34,6 | 37,5 B |
| | E 2,0 | 29,4 | 27,0 | 24,6 | 31,2 | 28,0 A |
| | średnia | 50,0 D | 46,2 B | 43,7 A | 47,5 C | |

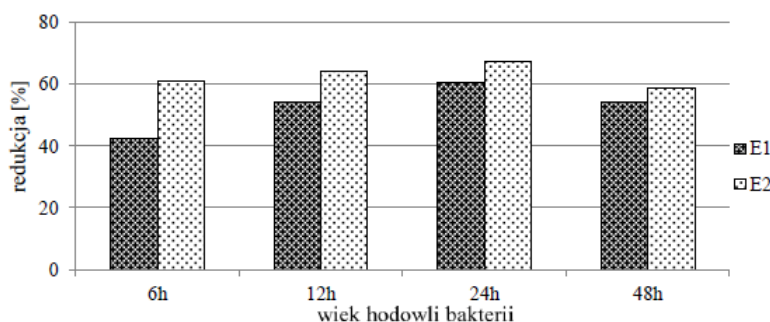
Jednakowymi literami oznaczono wartości nie różniące się istotnie przy poziomie $p \leq 0,01$

W porównaniu do próby kontrolnej zahamowanie kiełkowania *F. proliferatum* w obecności obu supernatantów było 2,5-4 krotnie niższe (wykres 1).

Wrażliwość zarodników *F. oxysporum* na metabolity zawarte w supernatantach była nieznacznie niższa niż stwierdzona u *F. proliferatum*. Po zastosowaniu supernatantów pochodzących z hodowli o gęstości E 1,0 procent kiełkujących zarodników wyniósł od 29,8 (24 h hodowla bakterii) do 43,7 (6 h hodowla bakterii) a stopień redukcji kiełkujących zarodników wyniósł od 42,3% do 60,6%. Natomiast w obecności supernatantów z hodowli o gęstości E 2,0 obserwowano dalsze wysoko istotne obniżenie zdolności kiełkowania zarodników o 3-14 punktów procentowych. Stopień redukcji zdolności kiełkowania wyniósł od 58,9% do 67,6%. Stwierdzono również statystycznie wysoko istotny wpływ supernatantów z hodowli 24 godzinnej w porównaniu do pozostałych oraz próby kontrolnej (tabela 3, wykres 2).



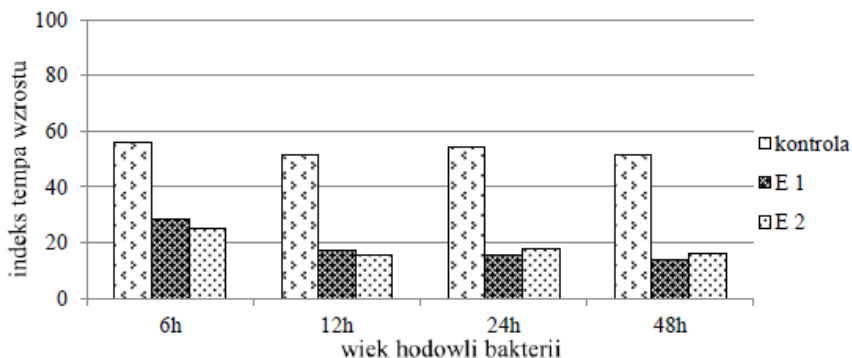
Wykres 1. Stopień redukcji zdolności kiełkowania zarodników *F. proliferatum* w obecności supernatantów *B. amyloliquefaciens* (%); OD₅₆₀ 1,0 (E 1) i OD₅₆₀ 2,0 (E 2)



Wykres 2. Stopień redukcji zdolności kiełkowania zarodników *F. oxysporum* w obecności supernatantów *B. amyloliquefaciens* (%); OD₅₆₀ 1,0 (E 1) i OD₅₆₀ 2,0 (E 2)

Również wcześniejsze badania własne [45] wykazały silne właściwości inhibicyjne szczepu *B. amyloliquefaciens* III14 wobec grzybów z rodzaju *Fusarium*. U wszystkich badanych grzybów: *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. tricinum* i *F. sporotrichoides* stopień zahamowania zdolności kiełkowania zarodników wyniósł od 82,9% do 100%. W nieco większym zakresie od 26,3 do 100% zahamowanie kiełkowania zarodników *F. oxysporum* f. sp. *spinace* w obecności supernatantów *B. amyloliquefaciens* Q-426 uzyskali Zhao i in. [30].

W przeprowadzonym doświadczeniu oceniono również wpływ *B. amyloliquefaciens* na liniowy wzrost grzybni *F. proliferatum* i *F. oxysporum* na podłożach PDA i szparagowym. Najślabsze tempo wzrostu *F. proliferatum* obserwowano na podłożu PDA w obecności supernatantów z hodowli E 2,0, które kształtowało się od 15,4 (12 h hodowla) do 24,9 (6 h hodowla). W porównaniu do próby kontrolnej stopień inhibicji liniowego wzrostu grzybni wyniósł od 55,4% do 70,1% (wykres 3, tabela 4).



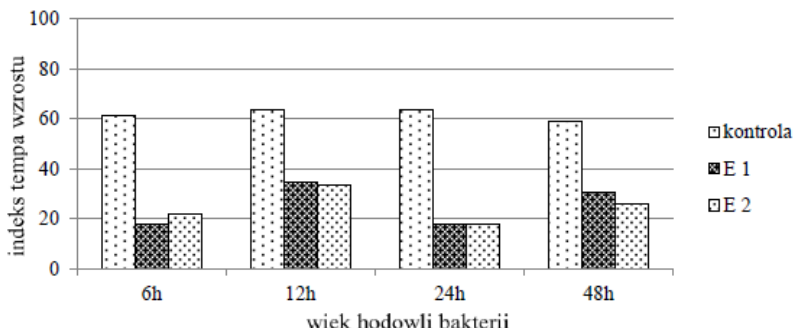
Wykres 3. Wpływ *B. amyloliquefaciens* na tempo wzrostu liniowego *F. proliferatum* na podłożu PDA; OD₅₆₀ 1,0 (E 1) i OD₅₆₀ 2,0 (E 2)

Tabela 4. Zahamowanie liniowego tempa wzrostu *F. proliferatum* w obecności supernatantów *B. amyloliquefaciens* na podłożach PDA i szparagowym (%)

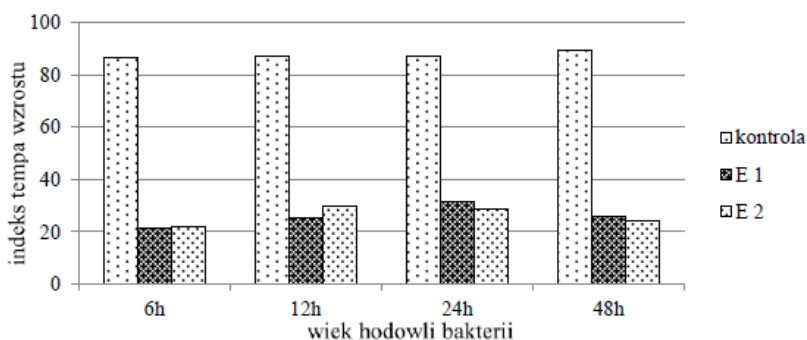
| Pożywka | Gęstość hodowli bakterii | Wiek hodowli <i>B. amyloliquefaciens</i> | | | |
|------------|--------------------------|--|--------|--------|--------|
| | | 6 h | 12 h | 24 h | 48 h |
| PDA | E 1,0 | 49,4 B | 66,5 B | 69,4 B | 72,4 A |
| | E 2,0 | 55,4 B | 70,1 A | 65,8 B | 68,7 B |
| Szparagowa | E 1,0 | 70,8 B | 45,7 D | 71,6 A | 48,4 C |
| | E 2,0 | 64,2 B | 46,9 D | 71,5 A | 56,1 C |

Jednakowymi literami (w wierszach) oznaczono wartości nie różniące się istotnie przy poziomie $p \leq 0,01$

Na podłożu szparagowym tempo wzrostu było nieznacznie szybsze niż na podłożu PDA. W hodowli z dodatkiem supernatantów o gęstości E 2,0 obserwowano najslabsze tempo wzrostu grzybni wynoszące od 18,1 (24 h hodowla) do 33,7 (12 h hodowla). Stopień inhibicji rozrostu grzybni wyniósł od 46,9% do 71,48% oraz od 45,7% do 71,6% odpowiednio dla supernatantów pochodzących z hodowli bakterii o E 2,0 i E 1,0 (tabela 4, wykres 4).



Wykres 4. Wpływ *B. amyloliquefaciens* na tempo wzrostu liniowego *F. proliferatum* na podłożu szparagowym; OD₅₆₀ 1,0 (E 1) i OD₅₆₀ 2,0 (E 2)



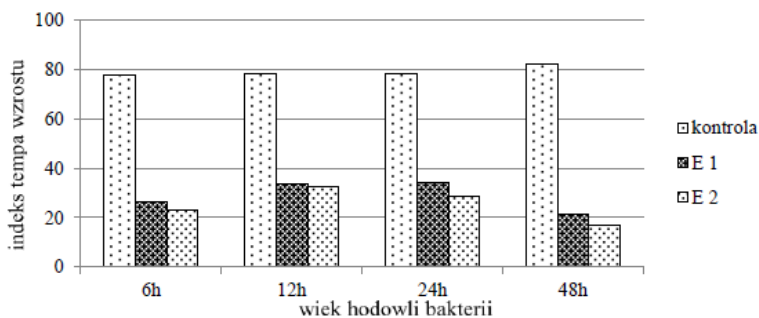
Wykres 5. Wpływ *B. amyloliquefaciens* na tempo wzrostu liniowego *F. oxysporum* na podłożu PDA; OD₅₆₀ 1,0 (E 1) i OD₅₆₀ 2,0 (E 2)

Na podłożu szparagowym w obecności supernatantów z hodowli o E 2,0 obserwowano słabsze tempo wzrostu grzybni *F. oxysporum* niż w przypadku hodowli o E 1,0. Różnice w indeksie tempa wzrostu grzybni między tymi supernatantami wynosiły od 1 do 5,5. W porównaniu do próby kontrolnej obserwowano wysoko istotne hamowanie *F. oxysporum* na poziomie 58,5-79,7% (hodowla o E 2,0) i 56,3-73,7% (hodowla o E 1,0) (tabela 5, wykres 6).

Tabela 5. Zahamowanie liniowego tempa wzrostu *F. oxysporum* w obecności supernatantów *B. amyloliquefaciens* na podłożach PDA i szparagowym (%)

| Pożywka | Gęstość hodowli bakterii | Wiek hodowli <i>B. amyloliquefaciens</i> | | | |
|----------------|--------------------------|--|---------|---------|---------|
| | | 6 h | 12 h | 24 h | 48 h |
| PDA | E 1,0 | 75,3 A | 70,9 Bb | 63,7 D | 70,9 Cc |
| | E 2,0 | 74,9 A | 65,9 Dd | 66,9 Cc | 73,2 B |
| Szparagow a | E 1,0 | 66,2 B | 57,3 C | 56,3 D | 73,8 A |
| | E 2,0 | 70,4 B | 58,5 C | 63,4 D | 79,7 A |

Jednakowymi literami dużymi (w wierszach) oznaczono wartości nie różniące się istotnie przy poziomie $p \leq 0,01$; małymi literami przy poziomie $p \leq 0,05$



Wykres 6. Wpływ *B. amyloliquefaciens* na tempo wzrostu liniowego *F. oxysporum* na podłożu szparagowym; OD₅₆₀ 1,0 (E 1) i OD₅₆₀ 2,0 (E 2)

Podobnie wcześniejsze badania własne [45, 46] nad wpływem wieku hodowli *B. amyloliquefaciens* III 14 oraz rodzaju podłoża hodowlanego wykazały wrażliwość grzybów z rodzajów *Fusarium* oraz *Alternaria*. Większą inhibicję tempa wzrostu grzybni notowano na podłożu PDA niż podłożu Czapka. Jednakże wrażliwość *Fusarium* sp. była niższa o 30-40 % w porównaniu do stwierdzonej u *F. proliferatum* i *F. oxysporum* wyizolowanych z szparagów. Natomiast największy stopień liniowego Bahamowania wzrostu *Alternaria* sp. (83,0%) stwierdzono po zastosowaniu supernatantów o gęstości E 2,0 i na podłożu PDA. Zhao i in. [30] oceniając szczep *B. amyloliquefaciens* Q-426 stwierdzili ograniczenie wzrostu grzybni *F. oxysporum*, *F. graminearum* i *F. moniliforme* w obecności supernatantu. Podobnie Vitullo i in. [33] uzyskali wysoką redukcję wzrostu grzybni *F. oxysporum* f. sp. *lycopersoci* (od 40,0 do 90,0%) w obecności metabolitów wytwarzanych przez *B. amyloliquefaciens* BO7. Grosu i in. [35] donoszą wysoką skuteczność szczepów *B. amyloliquefaciens* BIR oraz B3 wobec *F. culmorum* i *F. graminearum*, które spowodowały inhibicję wzrostu grzybni odpowiednio o 82-86% i 72-78%.

Antagonistyczne właściwości bakterii *B. amyloliquefaciens* wobec niektórych gatunków grzybów z rodzaju *Fusarium* m.in. *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. cucumerinum* są już opisywane w literaturze [25, 27, 32, 35]. Jednak w dalszym ciągu prowadzone są badania na tymi bakteriami, obejmujące poszukiwania nowych, bardziej aktywnych szczepów i ocenę czynników wpływających na ich aktywność przeciwgrzybową. Bardzo często skuteczne zahamowanie wzrostu fitopatogenów i/lub ich zarodnikowania jest wg badaczy wynikiem współdziałania i uzupełniania się różnych mechanizmów, które wpływają korzystnie na wzrost i rozwój roślin. Bezpośrednie oddziaływanie wiąże się z syntezą witamin, fitohormonów, wzbogacaniem gleby w składniki pokarmowe oraz zwiększaniem ich przyswajalności dla roślin a także zdolnością obniżania poziomu etylenu niekorzystnie wpływającego na ukorzenianie roślin. Oddziaływania pośrednie wynikają głównie ze zdolności inhibicji wzrostu patogenów i indukcji odporności roślin na choroby, poprawiając tym samym zdrowotność roślin. Możliwe jest to dzięki wytwarzaniu biologicznie aktywnych metabolitów m.in. antybiotyków, cyjanowodoru, sideroforów, jak również enzymów (chitynaz, celulaz, glukanaż, pektynaz) rozkładających ścianę komórkową oraz degradujących inne struktury komórkowe patogenów [25, 27-29, 31, 47, 48]. Istotną rolę w ograniczaniu wzrostu fitopatogenów i ich rozprzestrzenianiu odgrywają również metabolity lotne (m.in. etanol, butanol, acetoina, 2,3-butanodiol, kwas octowy, DMDS, DMTS) [25, 29, 49] oraz lipopeptydy z grupy iturin, surfaktin i fengicyn [25, 30, 31, 47, 50, 51], wytwarzane głównie przez *B. subtilis* i *B. amyloliquefaciens*.

Dane literaturowe wskazują również wpływ różnych substratów i ich stężenia, składu podłoża hodowlanego, jak również wpływ warunków fizykochemicznych i hodowlanych na syntezę lipopeptydów przez *Bacillus* sp. [25, 28, 47, 50]. Synteza tych związków może odbywać się w różnych fazach wzrostu komórek, jak również wynikać z indywidualnych właściwości każdego szczepu. Badania Pretourius i in. [28] wykazały zapoczątkowanie syntezy lipopeptydów przez *B. amyloliquefaciens* DSM 23117 pod koniec fazy wykładniczej, a zakończenie syntezy wraz ze spadkiem żywotności komórek. Skuteczność działania bakterii wobec grzybów zależy również od stężenia tych metabolitów [30, 32]. Chen i wsp. [32] obserwowali wraz ze wzrostem stężenia metabolitów wzrost fungistatycznego działania wobec *F. graminearum* i *F. oxysporum*.

Metabolity *Bacillus* spp. mogą również oddziaływać na zarodniki grzybów ograniczając ich ilość i deformując ich kształt, jak również na strzępki grzybni powodując zakłócenia w funkcjonowaniu błony komórkowej (m.in. wypływ K, Na, H, protein, kwasów nukleinowych). Przykładem są lipopeptydy np. z grupy fengicyn, które mogą powodować modyfikacje w błonie komórkowej i zmianę jej przepuszczalności [30, 32, 48]. Również pod wpływem metabolitów gazowych wytwarzanych przez *B. amyloliquefaciens* i *B. subtilis*, Chaves-Lopez i wsp. [29] obserwowali zmiany morfologiczne w obrębie grzybni (wakuolizacje, obrzmienie lub chudnięcie strzępek, redukcję pigmentu grzybni), jak również w wyglądzie zarodników grzyba a także redukcję ilości konidiów.

7. Podsumowanie

Szczep *B. amyloliquefaciens* wykazał silne właściwości antagonistyczne wobec *F. proliferatum* i *F. oxysporum*. Zdolność biotycznego oddziaływania była zależna od gęstości i wieku hodowli bakteryjnej oraz rodzaju pożywki. Na podłożu PDA obserwowano intensywniejsze hamowanie wzrostu *F. oxysporum* o ok. 3-10% a *F. proliferatum* o ok. 5-25% w porównaniu do pożywki szparagowej, w zależności od analizowanych parametrów. Najlepszy efekt fungistatyczny wobec *F. proliferatum* uzyskano po zastosowaniu 24-48 h hodowli bakterii, natomiast wobec *F. oxysporum* po zastosowaniu supernatantów z 48 h hodowli o gęstości E 2,0. Supernatanty *B. amyloliquefaciens* wykazały większy wpływ na wzrost grzybni *Fusarium proliferatum* niż na konidia, natomiast w stosunku do *F. oxysporum* na zdolność kiełkowania zarodników niż wzrost grzybni. Uzyskane w badaniach *in vitro* fungistatyczne oddziaływanie *B. amyloliquefaciens* wobec badanych grzybów daje podstawy do przeprowadzenia szerszych badań w tym zakresie.

Literatura

1. Czas sadzenia szparagów, www.farmer.pl/produkcja-roslinna/inne-uprawy/czas-sadzenia-szparagow,56702.html
2. Tuszyńska M. *Jak zmniejszyć ryzyko porażenia szparagów przez grzyby z rodzaju Fusarium?*, Nowości warzywnicze, 52 (2010), s.87-92
3. Wolny-Koładka K. *Grzyby z rodzaju Fusarium – występowanie, charakterystyka i znaczenie w środowisku*, Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych, 63,4 (2014), s. 623-633
4. Suchorzyńska M., Misiewicz A. *Mikotoksynotwórcze grzyby fitopatogeniczne z rodzaju Fusarium i ich wykrywanie*, Postępy mikrobiologii., 48, (3) (2009), s. 221-230
5. Ogórek R., Lejman A. *Wrażliwość grzybów Fusarium spp. na substancje aktywne wybranych fungicydów*, Episteme, 18 (2013), s. 263-276
6. Molinero-Ruiz L., Rubio-Perez E., Gonzalez-Dominguez E., Basallote-Ureba M.J. *Alternative hosts for Fusarium spp. causing crown and root rot of asparagus in Spain*, Journal of Phytopathology, 159 (2011), s. 114-116
7. Elmer W.H. *Asparagus in cennecticut and common diseases*, The Connecticut Agricultural Experiment Station: www.ct.gov/caes
8. Proctor R.H., Desjardins A.E., Moretti A. *Biological and chemical complexity of Fusarium proliferatum*, in: Strange R.N., Gullino M.L. *The role of plant pathology in food safety and food security.*, Springer Science+business Media B.V., Chapter 9, 2010, s. 97-110
9. Kalomira E. *Asparagus diseases*, The European Journal of Plant Sience and Biotechnology, 1 (1) (2007), s. 76-83
10. Andrzejak R., Werner M. *Grzyby z rodzaju Fusarium, uszkadzające wypustki szparagów i ich patogeniczność względem młodych roślin*, Progress in Plant Protection., 46 (2006), s. 700-703
11. Borrego-Benjumea A., Basallote-Ureba M. J., Melero-Vara J. M., Pervaiz A. *Abbasi. Characterization of Fusarium isolates from asparagus fields in southwestern Ontario and influence of soil organic amendments on Fusarium crown and root rot*, Phytopathology, 104, 4 (2014), s. 403-415
12. Weber Z., Karolewski L., Irzykowaska L., Knaflewski M., Kosiada T. *Occurrence of Fusarium species in spears of asparagus (Asparagus officinalis)*, Phytopathol. Pol., 45 (2007), s. 9-15
13. Corpas-Hervias C., Melero-Vara J. M., Molinero-Ruiz M. L., Zurera-Muñoz C., Basallote-Ureba M. J. *Characterization of Isolates of Fusarium spp. obtained from Asparagus in Spain*, Plant Disease, 90, 11 (2006), s. 1441-1451
14. Yergeau E., Sommerville D.W., Maheux E., Vujanovic V., Hamel Ch., Whalen J.K., St-Arnaud M. *Relationships between Fusarium population structure, soil nutrient status and disease incidence in field-grown asparagus*, FEMS Microbiology Ecology., 58 (2006), s. 394-403
15. Weber Z., Kostecki M., Barga S., Gossmann M., Waśkiewicz A., Bocianowski J., Knaflewski M., Buttner C., Golinski P. *Fusarium species colonizing spears and forming mycotoxins in field samples of asparagus from Germany and Poland*, Journal of Phytopathology, 154 (2006), s. 209-2016
16. Vujanovic V., Hamel C., Yergeau E., St-Arnaud M. *Biodiversity and biogeography of Fusarium species from northeastern North American*

- asparagus fields based on microbiological and molecular approaches, *Microbial Ecology*, 51 (2006), s. 242-255
17. Elmer W. H. *Management of Fusarium crown and root rot of asparagus*, *Crop Protection*, 73 (2015), s. 2-6
 18. Nothnagel T, Krämer R., Schreyer L., Rabenstein F. *Untersuchungen zum auftreten von braunverfärbungen bei spargel (Asparagus officinalis L.) unter besonderer berücksichtigung des befalls mit Fusarium spp. und viren in spargelanlagen Sachsen-Anhalts*, *Journal für kulturpflanzen*, 65, 2 (2013), s. 50-59
 19. Wang J., Wang X., Zhou Y., Du L., Wan Q. *Fumonisin detection and analysis of potential fumonisin-producing Fusarium spp. in asparagus (Asparagus officinalis L.) in Zhejiang Province of China*, *Journal of Science Food Agriculture*, 90 (2010), s. 836-842
 20. Borrego-Benjumea A.I., Melero-Vara J.M., Basallote-Ureba M. J. *Organic amendmets conditions on the control of Fusarium crown and root rot of asparagus caused by three Fusarium spp.*, *Spanish Journal of Agricultural Research*, 13, 4 (2015), s. 1-13
 21. Ha M.T., Huang J.W. *Control of Fusarium wilt of asparagus bean by organic soil amendment and microorganisms*, *Plant Pathology Bulletin*, 16 (2007), s. 169-180
 22. Baranowski T., Dankowska E., Kałużewicz A., Knaflowski M., Zaworska A. *Metodyka Integrowanej produkcji szparaga*, PRIORIN, (2014), https://piorin.gov.pl/download/gfx/piorin/pl/defaultstronaopisowa/1328/1/1/ip_szparaga_ed_2.pdf
 23. Rubio-Perez E., Molinero_Ruiz M.L., Melero-Vara J.M., Bassalote-Ureba M.J. *Selection of potential antagonists against asparagus crown and root rot caused by Fusarium spp.*, *Communications in agricultural and applied biological sciences*, 7, 2 (2008), s. 203-204
 24. Pocijowska M., Natywa M., Gałązka A. *Stymulacja wzrostu roślin przez bakterie PGPR*, *Kosmos, Problemy Nauk Biologicznych*, 63, 4 (2014), s. 603-610
 25. Perez-Gracia A., Romero D., Zerriouh H., Vicente A. *Biological control of phytopathogenic fungi by aerobic endospore-formers*, in: Logan N.A., *Endospore-forming soil bacteria*, *Soil biology* 27, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011, 157-180
 26. Pietraszek P., Walczak P. *Charakterystyka i możliwości zastosowania bakterii z rodzaju Bacillus wyizolowanych z gleby*, *Polish Journal of Agronomy*, 16 (2014), s. 37-44
 27. Qin Y., Hana Y., Yub Y., Shangb O., Zhanga B., Li P. *Complete genome sequence of Bacillus amyloliquefaciens L-S60, a plant growth-promoting and antifungal bacterium*, *Journal of Biotechnology*, 212 (2015), s.67-68
 28. Pretourius D., Rooyen J., Clarke K.G. *Enanced production of antifungal lipopeptides by Bacillus amyloliquefaciens for biocontrol of postharvest disease*, *New Biotechnology*, 32 (2015), s. 243-252
 29. Chaves-Lopez C., Serio A. A., Gianotti A., Sacchetti G., Ndagijimana M., Ciccarone C., Stellarini A., Corsetti A., Paparella A. *Diversity of food-borne Bacillus volatile compounds and influence on fungal growth*, *Journal of Applied Microbiology*, 119 (2015), s. 487-499

30. Zhao P., Quan C., Wang Y., Wahg J., Fan S. *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 as a potential biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f.sp. *spinaciae*, *Journal of Basic Microbiology*., 54 (2014), s. 448-456
31. Nam J., Yun H., Kim J., Kim P.I., Kim S.W., Lee H.B., Kim J.I., Lee C.W. *Isolation and NMR analysis of antifungal fengicin A and B from Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum BC-32-1*, *Bulletin of the Korean Chemical Society*., 36 (2015), s. 1316-1321
32. Chen L., Wang N., Wang X., Hu J., Wang S. *Characterization of two antifungal lipopeptides produced by Bacillus amyloliquefaciens SH-B10*, *Bioresource Technology*., 101 (2010), s. 8822-8827
33. Vitullo D., Pietro A.D., Romano A., Lanzotti A., Lima G. Role of new bacterial surfactins in the antifungal interaction between *Bacillus amyloliquefaciens* and *Fusarium oxysporum*, *Plant Pathology*., 61 (2012), s. 689-699
34. Ajilogba C.F., Babalola O.O., Ahmad F. *Antagonistic effects of Bacillus species in biocontrol of tomato Fusarium wilt*, *Ethno Medicine*., 7, 3 (2013), s. 205-216
35. Grosu A.I., Siciua O.A., Dobre A., Voaides C., Cornea P.C. *Evaluation of Some Bacillus spp. strains for the biocontrol of Fusarium graminearum and F. culmorum in wheat*, *Agriculture and Agricultural Science Procedia*., 6 (2015), s. 559-566
36. Domsch K.H., Gams W., Anderson T.H. *Compendium of Soil Fungi*, Academic Press, London 1980
37. Kwaśna H., Chełkowski J., Zajkowski P. *Flora Polska, Grzyby (Mycota)*, tom XXII, Sierpik (*Fusarium*). Pan, Warszawa-Kraków 1991
38. Burgiel Z., Kończyk D. *Reakcje grzyba Fusarium culmorum wyizolowanego z korzeni pszenicy ozimej na wybrane herbicydy*, *Acta Agraria Et Silvestria, Series Agraria*., XXVII (1989), s. 25-31
39. Burgiel Z. *Wpływ niektórych herbicydów na występowanie i rozwój patogenów powodujących choroby podsuszka pszenicy ozimej*, *Acta Agraria Et Silvestria, Series Agraria*., XXVIII (1984), s. 187-195.
40. Stępień Ł., Waśkiewicz A., Urbaniak M. *Wildly growing asparagus (Asparagus officinalis L.) hosts pathogenic Fusarium species and accumulates their mycotoxins*, *Microbial Ecology*., 71 (2016), s.927-937
41. Wong J.Y., Jeffries P. *Diversity of pathogenic Fusarium populations associated with asparagus roots in decline soils in Spain and the UK*, *Plant Pathology*., 55 (2006), s. 331-342
42. Nahiyani A.S.M., Robinson Boyer L., Jeffries P., Matsubara Y. *PCR-SSCP analysis of Fusarium diversity in asparagus decline in Japan*, *European Journal of Plant Pathology*., 130 (2011), s. 197-203
43. Waśkiewicz A., Irzykowska L., Bocianowski J., Karolewski Z., Kostecki M., Weber Z., Goliński P. *Occurrence of Fusarium and mycotoxins in marketable asparagus spears*, *Polish Journal of Environmental Studies*., 19, 1 (2010), s. 219-225
44. Waśkiewicz A., Irzykowska L., Drzewiecka K., Bocianowski J., Dobosz B., Weber Z., Zbigniew Karolewski Z., Krzyminiewski R., Goliński P. *Plant-pathogen interactions during infection process of asparagus with Fusarium spp.*, *Central European Journal of Biology*., 8, 11 (2013), s. 1065-1076

45. Grata K. *Effect of urea phosphate on the Bacillus sp. population in soli and antifungal activity of selected strains on Fusarium sp.*, Ecological Chemistry and Engineering A., 19, 1-2 (2012), s. 161-168
46. Grata K., Nabrdalik M. *Antifungal efficacy of Bacillus amyloliquefaciens against Alternaria sp.*, Proceedings of ECOpole., 9, 1 (2015), s. 79-85
47. Kumar A., Johri B.N. *Antimicrobial lipopeptides of Bacillus: natural weapons for biocontrol of plant pathogens*, in: Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology., Springer Science+business Media B.V., Chapter 6, (2012), s. 91-111
48. Cawoy H., Bettiol W., Fickers P., Ongena M. *Bacillus-based biological control of Plant diseases. Pesticides in the Modern World –Pesticides Use and Management*, www.intechopen.com/books/pesticides-in-the-modern-world-pesticides-use-and-management/bacillus-based-biological-control-of-plant-diseases., Chapter 13 (2013), s. 289-290
49. Effmert U., Kaldaras J., Warnke R. *Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil*, Journal of Chemical Ecology., 38 (2012), s. 665-703
50. Czaczyk K., Marciniak A., Białas W., Mueller A., Myszkka K. *Wpływ czynników środowiskowych na biosyntezę lipopeptydów przez Bacillus spp.*, ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość, 1, 50 (2007), s. 140-149
51. Argulles-Arias A., Ongena M., Halimi B., Lara Y., Brans A., Joris B., Fickers P. *Bacillus amyloliquefaciens GA I as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens*, Microbial Cell Factories., 8 (2009), s. 63-75

Aktywność biologiczna *Bacillus amyloliquefaciens* wobec *Fusarium* spp. wyizolowanych z pędów szparaga (*Asparagus officinalis* L.)

Streszczenie

Patogeny roślin, takie jak *Fusarium* spp. to najważniejsze czynniki, które co roku powodują znaczne straty i/lub uszkodzenia produktów rolnych. Celem przeprowadzonych badań była ocena in vitro właściwości biologicznych *B. amyloliquefaciens* wobec *F. proliferatum* i *F. oxysporum* wyizolowanych z pędów bielonego szparaga odmiany Grolim. W badaniach uwzględniono: gęstość i wiek hodowli bakterii, rodzaj podłoża oraz wpływ płynu hodowlanego. Ocenę właściwości antagonistycznych hodowli bakterii 6, 12, 24 i 48-godzinnych przeprowadzono w oparciu o wskaźniki: zdolność kiełkowania zarodników, tempo wzrostu liniowego i indeks tempa wzrostu grzybów z zastosowaniem podłoża PDA oraz szparagowego. Największe zahamowanie tempa wzrostu *F. oxysporum* w wysokości 75% stwierdzono po zastosowaniu supernatantów z 6-godzinnej oraz 79% dla 48-godzinnej hodowli *B. amyloliquefaciens*, odpowiednio na podłożach PDA i szparagowym. Indeks tempa wzrostu *F. proliferatum* był również silnie zahamowany i wyniósł około 72% po zastosowaniu supernatantów z 24-48 godzinnej hodowli. Ponadto stopień kiełkowania zarodników *F. oxysporum* był ograniczony w zakresie 42,3-67,6% a *F. proliferatum* w zakresie 57,5-75,0%. Wyniki badań sugerują, że szczep *B. amyloliquefaciens* wytwarzając związki przeciwbakteryjne i/lub bioaktywne, czyni go potencjalnym kandydatem do stosowania jako bezpieczny środek biologicznego zwalczania *Fusarium* spp.

Słowa kluczowe: szparagi, *B. amyloliquefaciens*, aktywność przeciwgrzybowa, *Fusarium* spp.

Biocontrol activities of *Bacillus amyloliquefaciens* against *Fusarium* spp. isolated from the white spears of asparagus (*Asparagus officinalis* L.)

Abstract

Plant pathogens such as *Fusarium* spp. are the most important factors that cause major losses and damages to agricultural products every years. The aim of the research was to assess "in vitro" a potential biological activity of *B. amyloliquefaciens* against *F. proliferatum* and *F. oxysporum* isolated from the white spears of asparagus "Grolim". In the conducted studies taken into account three factors: the bacterial cell density and age, the composition of the medium and influence of the cell-free supernatant. The antagonistic properties of bacterial metabolites (6, 12, 24 i 48-hours) were evaluated on the basis of germination index, as the linear growth of fungi and the growth rate index on PDA and asparagus media. The highest inhibition of the growth rate index of *F. oxysporum*, amounting almost 75 % was obtained for 6-hour hour cultures and 79 % for 48-hour hour cultures of *B. amyloliquefaciens* on PDA and asparagus media, respectively. The growth rate index of *F. proliferatum* was also strongly inhibited (amounted 72 %), when were applied 24-48-hours culture. Moreover the degree of fungal spore germination was limited in the range of 42.3-67.6 % for *F. oxysporum* and 57.5-75.0 % for *F. proliferatum*. Results obtained in this study suggested that *B. amyloliquefaciens* strain produced either a broad-spectrum antimicrobial compounds or several bioactive compounds making it a potential candidate for use as the safe biocontrol agents against *Fusarium* strains.

Keywords: asparagus, *B. amyloliquefaciens*, antifungal activity, *Fusarium* spp.

Analiza LZO emitowanych z odcieków składowiskowych techniką HS-SPME/GC-MS

1. Wstęp

Podstawowym sposobem postępowania z odpadami komunalnymi jest ich deponowanie na składowiskach. Konsekwencją składowania odpadów jest powstawanie odcieków, których charakterystyczną cechą jest zróżnicowany skład chemiczny zmieniający się zależnie od rodzaju deponowanych odpadów oraz sposobu eksploatacji składowiska. Gazy powstające w wyniku naturalnego rozkładu na składowiskach zwykle składają się z metanu (50-60%), ditlenku węgla (40%), resztę stanowią niemietanowe lotne związki organiczne [1, 2]. Zgodnie z definicją podaną w Rozporządzeniu Ministra Środowiska z dnia 20 grudnia 2005 roku do grupy lotnych związków organicznych (LZO) należą związki organiczne mające w temperaturze 293,15 K prężność par nie mniejszą niż 0,01 kPa, względnie posiadające analogiczną lotność w szczególnych warunkach użytkowania [3].

Konsekwencją obecności LZO w odciekach jest ich negatywny wpływ na jakość powietrza. LZO biorą udział w szeregu reakcji fotochemicznych prowadzących do wytworzenia szkodliwych, a nawet toksycznych produktów, np. ozon i nadtlenki organiczne. Ponadto mogą przyczynić się do zmian globalnych powodując ubytek ozonu stratosferycznego i wzrost zawartości ozonu troposferycznego [4]. Utlenianie LZO w obecności tlenków azotu prowadzi do powstania smogu fotochemicznego, produktów szkodliwych dla ludzi, zwierząt i roślinności. Lotne i średnio lotne związki organiczne mogą także wywoływać podrażnienie oczu, gardła, uszkodzenie wątroby i ośrodkowego układu nerwowego oraz inne poważne skutki zdrowotne. Wiele z nich wykazuje właściwości toksyczne, kancerogenne, mutagenne lub neurotoksyczne na organizmy żywe [5]. Badania pokazują, że długotrwałe narażenie na LZO może przyczynić się do rozwoju takich chorób jak nowotwory płuc, białaczka, chłoniak [6]. Dodatkowo organiczne związki siarki, alkilobenzeny i niektóre estry są odpowiedzialne za niepożądany zapach, co skutkuje pogorszeniem warunków bytowych

¹ j.kapelewska@uwb.edu.pl, Instytut Chemii, Wydział Biologiczno-Chemiczny, Uniwersytet w Białymstoku, www.uwb.edu.pl

ludzi [4, 7, 8]. Z tych powodów emisja lotnych związków organicznych podlega licznym ograniczeniom. W Europie jest regulowana przez dyrektywę Unii Europejskiej [9, 10].

Badania przeprowadzone w krajach rozwiniętych takich jak Dania, Szwecja czy Wielka Brytania potwierdziły obecność LZO, m.in. benzenu, toluenu, etylobenzenu oraz ksyłenu zarówno w gazie wysypiskowym, jak i w odciekach ze składowisk odpadów komunalnych [11, 12]. Zou i współpracownicy [2] przeprowadzili monitoring powietrza atmosferycznego na składowisku odpadów komunalnych, gdzie w badanych próbkach zidentyfikowali i oznaczyli ilościowo 50 związków, między innymi należących do grup węglowodorów aromatycznych, chlorowcopochodnych węglowodorów alifatycznych i aromatycznych oraz terpenów. Inna grupa naukowców przeprowadziła badania nad składem substancji emitowanych z ulicznych koszy na śmieci, w wyniku których zidentyfikowano ponad 150 substancji lotnych [13, 14].

Przygotowanie próbek środowiskowych do analizy nie jest zadaniem łatwym, głównie ze względu na niewielką zawartość analizowanych substancji oraz skomplikowany skład matrycy. Dlatego też, szczególnego znaczenia nabiera właściwe przeprowadzenie etapu wzbogacania i/lub izolacji analitów. Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej (Solid Phase Microextraction – SPME) stała się jedną z podstawowych technik przygotowania próbek środowiskowych do analizy [15, 16]. SPME może być stosowana w dwóch wariantach. W przypadku oznaczeń związków lotnych, analizie poddaje się fazę nadpowierzchniową – gazową (Head Space – HS), zaś dla związków o słabej lotności stosuje się tak zwane bezpośrednie zanurzenie elementu sorpcyjnego w próbce (Direct Immersion – DI). Technika izolacji SPME jest często wybierana do jednoczesnej analizy dużej liczby grupy związków o różnych właściwościach fizykochemicznych.

2. Cel pracy

Celem niniejszej pracy było przeprowadzenie analizy jakościowej lotnych związków organicznych obecnych w odciekach ze składowiska odpadów komunalnych pobranych z wybranych Zakładów Utylizacji Odpadów Komunalnych znajdujących się na terenie województwa podlaskiego.

3. Materiały i metody

3.1. Próbkę środowiskowe

Próbki odcieków pobierane do badań pochodziły z czterech Zakładów Utylizacji Odpadów Komunalnych (ZUOK) innych niż niebezpieczne i obojętne, znajdujących się na terenie województwa podlaskiego. Wszystkie

składowiska uzyskały pozwolenie zintegrowane. Ponadto różnią się one wielkością, wiekiem, sposobem gromadzenia odpadów oraz sposobem izolacji. W ZUOK w Hryniewiczach wody odciekowe pochodzące z czynnego oraz z zamkniętego pola składowiskowego zbierane są do wspólnego basenu odciekowego. Natomiast w Zakładzie Utylizacji i Przetwarzania Odpadów (ZUiPO) w Czerwonym Borze odcieki pochodzące z niecki czynnej i z niecki zamkniętej zbierane są do oddzielnych studni odciekowych. W tabeli 1 przedstawiono charakterystykę składowisk odpadów komunalnych z których pobierano próbki środowiskowe.

Materiał do badań pobierano do szklanych butelek i przywożono do laboratorium. Analizę związków organicznych emitowanych przez odcieki składowiskowe wykonywano bezpośrednio po przywiezieniu do laboratorium.

Tabela 1. Charakterystyka badanych składowisk odpadów komunalnych

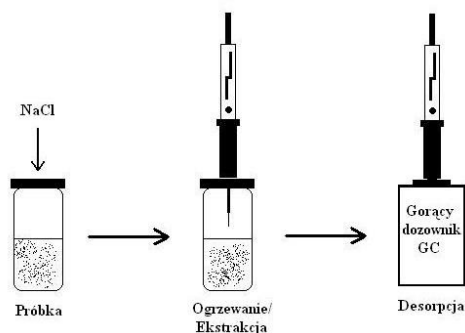
| | | Hryniewicze | Czerwony Bór | Uhowo | Knyszyn |
|------------------------------|---------|--|----------------------|-----------------|------------|
| Status | | czynne/ zamknięte | czynne/ zamknięte | zamknięte | zamknięte |
| Pojemność [m ³] | | 242 311 | 480 000 | 45 092 | 60 000 |
| Rodzaj izolacji | | izolacja mieszana (sztuczna/ naturalna) | folia PCV | brak danych | sztuczna |
| Sposób zbierania odcieków | | baseny odciekowe | studnie odciekowe | | |
| Liczba piezometrów | | 4 | | | 3 |
| Klasa wód gruntowych* | 2011 r. | V, V, V, I | II, II | IV, V, V, IV | IV, III, V |
| | 2012 r. | V, V, V, V | II, I, II, II | V, V, V, V | V, V, IV |

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [17]* na podstawie Rozporządzenia Ministra Środowiska z dnia 23 lipca 2008 r. w sprawie kryteriów i sposobu oceny stanu wód gruntowych

3.2. Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej (SPME)

Ekstrakcję lotnych związków organicznych prowadzono poprzez umieszczenie włókna do mikroekstrakcji w fazie nadpowierzchniowej nad próbką, a więc przy zastosowaniu wariantu HS-SPME. Izolację LZO prowadzono przy użyciu włókna z fazą stacjonarną CAR/PDMS (Carboxen/Polidimetylosiloksan) o grubości 75 μm. Przed przystąpieniem do analizy chromatograficznej włókno ekstrakcyjne poddawano kondycjonowaniu w warunkach zalecanych przez producenta (0,5 h w 280 °C, w atmosferze przepływającego helu).

W celu dokonania izolacji LZO próbkę odcieków o objętości 10 mL wraz z dodatkiem 1g chlorku sodu umieszczano w szklanej fiolece o pojemności 15 mL. Do fazy nadpowierzchniowej nad próbką wprowadzano włókno z fazą CAR/PDMS. Proces izolacji lotnych związków organicznych prowadzono w czasie 30 minut. Przez cały czas kontaktu włókna z fazą gazową, roztwór utrzymywano w temperaturze 40°C przy jednoczesnym mieszaniu z prędkością 7000 obrotów/minutę za pomocą mieszadła magnetycznego MR 3001K (produkcja Heidolph). Po zakończeniu ekstrakcji włókno z wyekstrahowanymi analitami przenoszono do dozownika aparatu GC-MS. Włókno wysuwano w głąb dozownika na głębokość 2,5 cm. Etap termodesorpcji trwał 15 minut. Zestaw do izolacji LZO z próbek wód odciekowych przedstawiono na Rys. 1.



Rysunek 1. Schemat przebiegu procesu izolacji lotnych związków organicznych emitowanych z wód odciekowych

3.3. Analiza GC-MS

Do oznaczeń wykorzystano chromatograf gazowy HP 6890 N z elektroniczną kontrolą ciśnienia (EPC) 59864B, wyposażony w detektor MS 5973, a także kolumnę kapilarną HP-5MS (30m × 0,25mm × 0,25 μm) oraz dozownik typu split/splitless. Warunki pracy układu chromatograficznego przedstawiono w Tabeli 2.

3.4. Identyfikacja związków

Podczas analizy chromatograficznej uzyskano dwa rodzaje niezależnych od siebie informacji identyfikacyjnych: dane retencyjne oraz widma mas. Widma mas zarejestrowane dla poszczególnych pików chromatograficznych porównywano komputerowo z widmami mas zgromadzonymi w bazie danych NIST MS (około 400 tysięcy związków).

Tabela 2. Parametry oznaczenia chromatograficznego (GC/MS)

| Parametr | | Wartość |
|---|--------------------------------|---------------------|
| Temperatura początkowa pieca | | 37 °C |
| Izoterma początkowa | | 7 min |
| Szybkość wzrostu temperatury | | 3 °C/min do 200 °C |
| Izoterma końcowa | | 10 °C/min do 300 °C |
| Temperatura dozownika | | 250 °C |
| Gaz nośny | | HHHHHhhhel |
| Objętościowe natężenie przepływu gazu nośnego | | 1 mL/min |
| Tryb pracy dozownika | | splitless |
| Odcinanie rozpuszczalnika | | brak |
| Warunki pracy detektora | Tryb pracy detektora | SCAN |
| | Temperatura źródła jonów | 230 °C |
| | Temperatura kwadrupola | 150 °C |
| | Temperatura linii transferowej | 280 °C |
| | Zakres mas m/z | 29-600 |
| Czas analizy | | 80 min |

Do identyfikacji składników złożonych mieszanin związków o różnej strukturze, jakim są próbki odcieków ze składowisk komunalnych, nie wystarcza jednak wykorzystanie jednego parametru analitycznego, jakim jest widmo mas. Drugim etapem identyfikacji było więc wyznaczenie indeksów retencji związków oznaczanych i porównanie ich z wartościami literaturowymi.

Indeksy retencji (IR_x) związków obliczono na podstawie wzoru na arytmetyczny indeks retencji Van den Doola i Kratza [18], stosowanego w przypadku analiz prowadzonych z programowanym wzrostem temperatury (1):

$$IR_x = 100z + 100 \frac{t_R(x) - t_R(z)}{t_R(z+1) - t_R(z)} \quad (1)$$

gdzie: $t_R(x)$ – czas retencji badanego związku, $t_R(z)$ i $t_R(z+1)$ – czas retencji n -alkanów zawierających odpowiednio z i $z+1$ atomów węgla w cząsteczce, pomiędzy którymi znajduje się związek x .

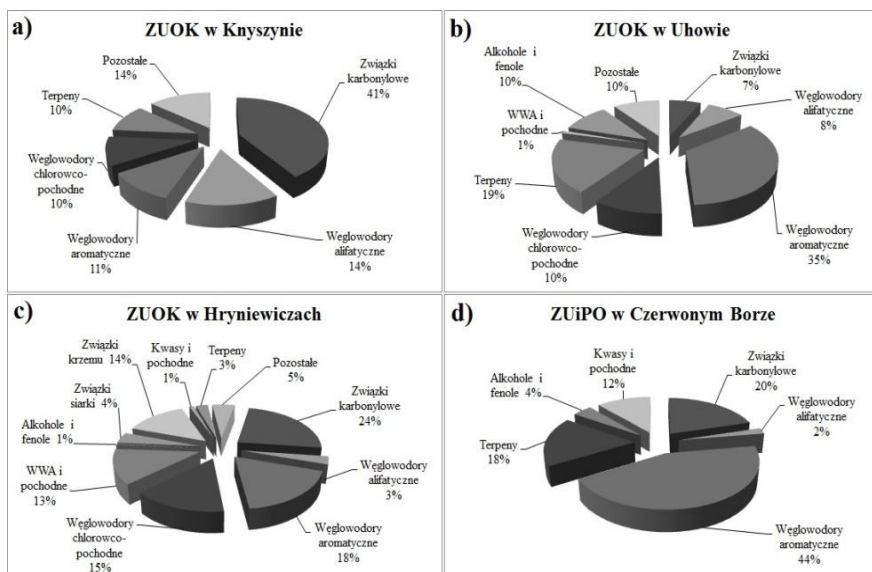
Wyznaczone wartości indeksu każdego z poszczególnych związków organicznych porównywano z dostępnymi w postaci katalogów bazami danych oraz komputerową bazą danych stworzoną w Zakładzie Chemii Środowiska Uniwersytetu w Białymstoku.

Związek uznano za poprawnie zidentyfikowany, jeśli otrzymane widmo mas wykazywało dobrą zgodność z widmem w bazie danych oraz różnica między wyliczonym a literaturowym indeksem retencji była nie większa niż ± 10 jednostek. W przypadkach, gdy nie był dostępny literaturowy indeks retencji, a widmo mas było jednoznaczne, identyfikację prowadzono tylko w oparciu o widmo mas.

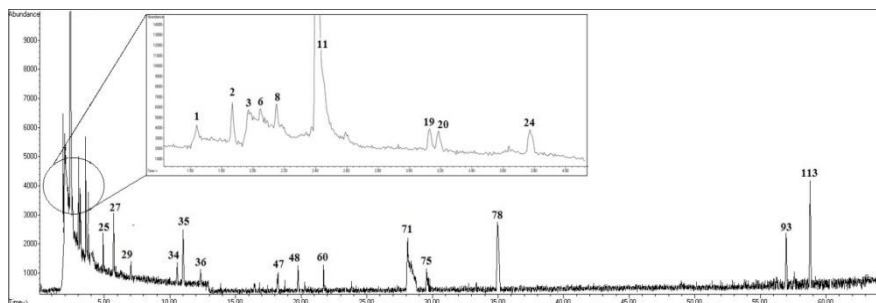
4. Analiza wyników

W Tabeli 3 przedstawiono wyniki identyfikacji poszczególnych związków organicznych wyizolowanych z sześciu próbek odcieków ze składowisk odpadów. Przykładowy chromatogram uzyskany podczas analizy odcieków przedstawiono na Rysunku 2. Podczas analizy próbek wód odciekowych zarejestrowano ponad 110 różnych związków, spośród których zidentyfikowano około 100 należących do lotnych oraz średniolotnych związków organicznych. Największy udział w ogólnej ilości związków organicznych emitowanych przez odcieki składowiskowe mają węglowodory aromatyczne (27,0%) oraz związki karbonylowe (23,0%). Znaczna była także zawartość terpenów (12,5%). W badanych próbkach odcieków składowiskowych pobranych z Zakładu Utylizacji Odpadów Komunalnych w Knyszynie oraz w Hryniewiczach największą ilość, spośród emitowanych, stanowiły związki karbonylowe (41% i 23% odpowiednio). W próbkach środowiskowych pobranych z ZUiPO w Czerwonym Borze i z ZUOK w Uhowie największą ilość stanowiły węglowodory aromatyczne (44% i 35% odpowiednio). Najbardziej zróżnicowanym składem chemicznym charakteryzowały się próbki wód odciekowych pochodzących z Hryniewicz (emitowane związki zaklasyfikowano do 10 grup). Procentowy udział poszczególnych grup lotnych i średniolotnych związków organicznych występujących w odciekach przedstawiono na Rysunku 3.

Niektóre spośród wykrytych substancji w badanych odciekach wykazują szkodliwe działanie na zdrowie ludzi oraz środowisko naturalne. Dziesięć związków znajduje się na liście substancji, których oznaczanie w środowisku jest zalecane przez Agencję Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych (US EPA) są to: aceton, benzen, toluen, *p*-ksylen, *o*-ksylen, trichlorometan, 1,2,3-trichlorobenzen, 1,2,3,5-tetrachlorobenzen, disiarczek węgla oraz naftalen. Większość z nich należy także do priorytetowych zanieczyszczeń według US EPA. Są to: benzen, toluen, etylobenzen, trichloroetylen, 1,2,3-trichlorobenzen, 1,2,3,5-tetrachlorobenzen oraz naftalen.



Rysunek 3. Diagramy przedstawiające średni procentowy udział poszczególnych grup związków organicznych emitowanych przez odcieki składowiskowe w Knyszynie (a), Uhowie (b), Hryniewiczach (c) oraz Czerwonym Borze (d)



Rysunek 2. Chromatogram uzyskany podczas analizy LZO w odciekach ze składowiska odpadów komunalnych w Hryniewiczach (numeracja pików zgodna z liczbą porządkową w Tabeli 3)

Tabela 3. Wyniki identyfikacji związków organicznych emitowanych przez odcieki składowiskowe

| Lp. | Wynik identyfikacji | I_{exp} | I_{lit} | Trzy największe piki m/z | Zawartość [%] | | | |
|-----|---------------------|-----------|-----------|--------------------------|---------------|------|------|------|
| | | | | | M1 | M2 | M3 | M4 |
| 1. | Metanol | < 600 | 381 | 31, 29, 32 | - | - | 0,18 | - |
| 2. | Aceton | < 600 | 500 | 43,58, 42 | 38,8 2 | 2,15 | 1,52 | 5,34 |
| 3. | Siarczek dimetylu | < 600 | 514 | 62, 47, 45 | - | - | 1,08 | - |

| | | | | | | | | |
|-----|--------------------------|-------|-----|---------------|------|-----------|------|-----------|
| 4. | Eter dietylowy | < 600 | 509 | 31, 59, 74 | - | 0,46 | - | 0,23 |
| 5. | 2-Metylopropan-2-olu | < 600 | 526 | 59, 41, 31 | - | 0,28 | - | 0,31 |
| 6. | Disiarczek węgla | < 600 | 540 | 76, 78, 44 | - | - | 1,10 | - |
| 7. | Trimetylosilanol* | <600 | - | 75, 45, 29 | - | - | 5,01 | - |
| 8. | 2-Metylopropanol | < 600 | 556 | 43, 41, 72 | - | 0,28 | 0,23 | 0,42 |
| 9. | 2-(Metylosililo) etanol* | < 600 | - | 75, 73, 45 | - | 1,97 | - | 1,57 |
| 10. | n-Heksan | 600±1 | 600 | 57, 41, 43 | 9,34 | - | 1,62 | - |
| 11. | 2-Butanon | 600±1 | 601 | 43, 72, 29 | - | - | 7,17 | 5,68 |
| 12. | Kwas octowy | 606±1 | 602 | 43, 45, 60 | - | - | 0,87 | 3,27 |
| 13. | Octan etylu | 613±1 | 612 | 43, 29, 45 | - | 0,20 | 0,94 | - |
| 14. | Trichlorometan | 613±3 | 616 | 83, 85, 43 | 4,94 | 0,05 | 0,24 | - |
| 15. | 2-Etoksy-2-metylopropan | 618±1 | 615 | 59, 87, 57 | - | 0,29 | - | - |
| 16. | Tetrahydrofuran | 623±1 | 629 | 42, 46, 72 | - | 0,36 | 0,34 | 0,59 |
| 17. | Propionian metylu | 625±1 | 627 | 57, 29, 88 | - | - | - | 0,29 |
| 18. | 3-Propoksypropan | 647±1 | - | 41, 58, 29 | - | 0,64 | 2,01 | 0,90 |
| 19. | Benzen | 653±1 | 657 | 78, 77, 50 | 2,64 | 1,90 | 1,62 | 0,77 |
| 20. | 2-Metylobutanal | 657±1 | 658 | 57, 29, 41 | - | 0,26 | 0,07 | 0,41 |
| 21. | Aldehyd pentanowy | 700±1 | 695 | 44, 29, 58 | - | 0,46 | 5,29 | - |
| 22. | Kwas propionowy | 708±1 | 700 | 57, 29, 88 | - | - | - | 7,46 |
| 23. | Artefakt* | 701±1 | - | 77, 45, 78 | - | - | 8,86 | - |
| 24. | Trichloroetylen | 695±4 | 702 | 95, 132, 130 | 1,84 | 7,73 | 0,29 | - |
| 25. | 4-Metylopentan-2-on | 732±1 | 736 | 43, 58, 57 | - | - | 0,04 | 5,71 |
| 26. | 3-Metylopentan-2-on | 745±1 | 750 | 43, 57, 29 | - | - | 0,22 | - |
| 27. | Toluen | 756±4 | 753 | 91, 92, 65 | 1,64 | 15,4 6 | 6,61 | 7,72 |
| 28. | Butan-2,3-diol | 773±1 | 769 | 65, 45, 51 | - | 7,74 | - | - |
| 29. | 2,4-Dimetylopentan-3-on | 794±2 | 794 | 43, 71, 41 | - | 0,54 | 0,65 | 1,86 |
| 30. | 4-Metylopent-3-en-2-on | 795±1 | 798 | 83, 55, 98 | 1,54 | - | - | - |
| 31. | Heksanal | 803±1 | 799 | 44, 29, 58 | - | 1,07 | 7,94 | - |
| 32. | Octan butylu | 818±1 | 813 | 43, 56, 55 | - | - | 2,72 | - |
| 33. | Chlorobenzen | 842±2 | 844 | 112, 77, 114 | 0,64 | 0,69 | - | - |
| 34. | Etylobenzen | 857±1 | 857 | 91, 106, 51 | 0,74 | 2,00 | 1,14 | 6,05 |
| 35. | p,m-Ksylene | 866±1 | 866 | 91, 106, 105 | 1,54 | 3,66 | 3,12 | 18,4 5 |
| 36. | o-Ksylene | 889±1 | 879 | 91, 106, 105 | - | 2,45 | 0,84 | 4,58 |
| 37. | Chlorocykloheksan | 885±1 | 888 | 67, 82, 41 | 2,74 | - | - | - |
| 38. | Metoksyfenylooksym | 912±1 | - | 133, 151, 135 | - | - | 2,00 | - |

| | | | | | | | | |
|-----|---------------------------------------|--------------|------|---------------|------|------|------|------|
| 39. | α -Tujen | 929 \pm 1 | 925 | 93, 91, 92 | - | - | 0,21 | - |
| 40. | α -Pinen | 934 \pm 1 | 936 | 93, 92, 91 | 0,24 | - | - | - |
| 41. | 3-Metyloheptan-2-on | 955 \pm 1 | 946 | 43, 46, 57 | - | 0,14 | - | - |
| 42. | 1-Etylo-4-etylobenzen | 965 \pm 1 | 962 | 109, 124, 83 | 0,64 | - | - | - |
| 43. | Oktan-4-on | 970 \pm 1 | 970 | 43, 41, 57 | - | 0,29 | - | - |
| 44. | 1-Etylo-4-metylobenzen | 960 \pm 1 | 960 | 105, 103, 79 | - | 2,28 | - | - |
| 45. | 1-Etylo-3-metylobenzen | 967 \pm 1 | 968 | 120, 105, 119 | - | 0,93 | - | - |
| 46. | 1-Etyl-2-metylobenzen | 977 \pm 1 | 977 | 105, 120, 77 | 0,34 | 0,69 | - | - |
| 47. | 1,2,4-Trimetylobenzen | 990 \pm 1 | 984 | 105, 120, 82 | - | 0,39 | - | - |
| 48. | 1,3,5-Trimetylobenzen | 994 \pm 4 | 994 | 105, 120, 77 | 1,44 | 2,08 | 0,59 | 1,09 |
| 49. | 3-Karen | 1011 \pm 5 | 1010 | 93, 146, 148 | 1,94 | 1,04 | - | - |
| 50. | 1,2,3-Trimetylobenzen | 1018 \pm 1 | 1020 | 105, 120, 106 | - | - | 0,20 | - |
| 51. | o-Cymen | 1022 \pm 1 | 1022 | 119, 134, 91 | - | 0,54 | 1,44 | - |
| 52. | 1-p-Menten | 1030 \pm 1 | 1023 | 95, 68, 67 | 2,84 | - | - | - |
| 53. | m-Cymen | 1021 \pm 1 | 1023 | 119, 134, 91 | - | - | - | 3,39 |
| 54. | Eukaliptol | 1027 \pm 1 | 1023 | 43, 81, 111 | - | 1,76 | - | 4,39 |
| 55. | p-Cymen | 1023 \pm 1 | 1025 | 119, 81, 67 | - | 0,74 | - | - |
| 56. | 1,2-Dichlorobenzen | 1030 \pm 1 | 1030 | 146, 148, 119 | - | 0,99 | - | - |
| 57. | NN | 1032 \pm 1 | - | 57, 41, 43 | - | - | - | 1,10 |
| 58. | 1,4,6-Trimetylohept-3-en | 1036 \pm 1 | - | 83, 69, 55 | - | - | - | 1,12 |
| 59. | 1-Metylo-4-(1-metyloetylo)cykloheksen | 1041 \pm 1 | 1040 | 95, 68, 55 | 1,94 | - | - | - |
| 60. | Butylobenzen | 1054 \pm 1 | 1054 | 91, 92, 134 | - | - | 0,21 | - |
| 61. | Fenchon | 1084 \pm 1 | 1087 | 81, 69, 41 | - | 5,11 | 0,29 | 2,71 |
| 62. | α ,p-Dimetylostyren | 1087 \pm 1 | 1096 | 132, 117, 115 | - | 0,24 | - | - |
| 63. | Dekahydronaftalen, cis- | 1092 \pm 1 | 1097 | 81, 96, 138 | - | - | 0,02 | - |
| 64. | 1-Bromo-4-chlorobenzen | 1094 \pm 1 | - | 192, 190, 111 | - | 0,64 | - | - |
| 65. | 1-Bromo-3- | 1098 \pm | - | 57, 192, | - | 0,24 | - | - |

| | chlorobenzen | 1 | | 43 | | | | |
|-----|---|------------|------|------------------|------|------|-----------|------|
| 66. | Nonanal | 1103± 1 | 1102 | 57, 41, 56 | - | 0,69 | - | - |
| 67. | (+)-2-Bornanon | 1139± 1 | 1144 | 95, 81, 41 | - | 8,60 | | - |
| 68. | (-)-Kamfora | 1139± 1 | 1145 | 95, 81, 108 | - | - | 2,23 | 9,77 |
| 69. | Pinokarwon | 1162 ±1 | 1162 | 81, 53, 108 | 0,34 | - | - | - |
| 70. | Mentol | 1172± 1 | 1173 | 81, 95, 71 | - | - | - | 2,09 |
| 71. | Naftalen | 1178± 1 | 1179 | 128, 127, 129 | - | - | 13,0 4 | - |
| 72. | Dodekan | 1198± 1 | 1200 | 57, 43, 71 | - | 0,44 | - | - |
| 73. | NN | 1202± 1 | - | 83, 95, 71 | - | - | - | 2,12 |
| 74. | Dodekanal | 1205± 1 | 1203 | 57, 43, 55 | - | 0,34 | - | - |
| 75. | 1,2,3- Trichlorobenzen | 1207± 1 | 1205 | 105, 120, 106 | - | - | 3,21 | - |
| 76. | Keton C ₁₁ H ₂₂ O | 1226± 1 | - | 45, 55, 67 | 0,74 | - | - | - |
| 77. | Tridekan | 1298± 1 | 1300 | 57, 43, 71 | - | 0,29 | - | - |
| 78. | 1,2,3,5- Tetrachlorobenzen | 1324± 1 | 1314 | 216, 214, 218 | - | - | 11,2 2 | - |
| 79. | 1,2-Dihydro-1,2,6- trimetylnaftalen | 1352± 1 | - | 157, 142, 141 | - | 0,24 | - | - |
| 80. | NN | 1365± 1 | - | 177, 207, 41 | - | 0,65 | - | 0,30 |
| 81. | α-Kopajen | 1377± 1 | 1376 | 161, 119, 105 | 0,24 | - | - | - |
| 82. | Tetradekan | 1397± 1 | 1400 | 57, 71, 43 | - | 0,24 | - | - |
| 83. | β-Cedren | 1417± 1 | 1417 | 161, 204, 105 | - | 0,24 | - | - |
| 84. | (E)-β-Kariofilen | 1421± 1 | 1421 | 93, 133, 91 | 0,64 | - | - | - |
| 85. | cis-Tujopsen | 1428± 1 | 1429 | 119, 123, 105 | 0,34 | - | - | - |
| 86. | α-Humulen | 1456± 1 | 1454 | 93, 80, 41 | 1,04 | - | - | - |
| 87. | E-β-Farnezen | 1460± 1 | 1459 | 41, 93, 69 | 0,64 | - | - | - |
| 88. | NN | 1466± 1 | - | 177, 220, 135 | - | 0,54 | - | - |
| 89. | Z-β-Farnezen | 1466± 1 | 1468 | 41, 93, 69 | 1,94 | - | - | - |
| 90. | β-Chamigren | 1471± 1 | 1475 | 107, 136, 189 | - | 0,24 | - | - |
| 91. | γ-Muurolen | 1477± | 1477 | 161, 105, | - | 0,39 | - | - |

| | | 1 | | 43 | | | | |
|------|------------------------|------------|------|------------------|-----------|------|------|---|
| 92. | Seskwiterpen | 1482± 1 | - | 161, 185, 204 | 1,94 | - | - | - |
| 93. | Siarka; S ₆ | 1483± 1 | - | 64, 192, 128 | - | - | 0,95 | - |
| 94. | β-Selenen | 1484± 1 | 1485 | 41, 93, 107 | 0,74 | - | - | - |
| 95. | β-cis-Guajen | 1480± 1 | 1490 | 105, 137, 93 | - | 0,39 | - | - |
| 96. | α-Selenen | 1491± 1 | 1494 | 189, 161, 204 | - | 0,54 | - | - |
| 97. | β-Himachalen | 1495± 1 | 1499 | 119, 105, 161 | - | 0,24 | - | - |
| 98. | n-Pentadekan | 1498± 2 | 1500 | 57, 147, 71 | - | 0,54 | 1,35 | - |
| 99. | γ-Kadinen | 1514± 1 | 1513 | 161, 105, 119 | - | 0,74 | - | - |
| 100. | δ-Kadinen | 1524± 1 | 1524 | 159, 161, 119 | - | 3,54 | - | - |
| 101. | NN | 1531± 1 | - | 173, 55, 99 | - | 7,95 | - | - |
| 102. | α-Kadinen | 1532± 1 | 1538 | 119, 105, 161 | - | 0,69 | - | - |
| 103. | α-Kalakoren | 1544± 1 | 1542 | 157, 142, 141 | - | 1,14 | - | - |
| 104. | Seskwiterpenoid | 1586± 1 | - | 220, 105, 91 | - | 0,34 | - | - |
| 105. | (R)-Kuparen | 1562± 1 | - | 132, 131, 145 | 1,74 | - | - | - |
| 106. | NN | 1579± 1 | - | | 13,5 4 | - | - | - |
| 107. | n-Heksadekan | 1596± 1 | 1600 | 71, 57, 43 | - | 0,49 | - | - |
| 108. | Seskwiterpenoid | 1623± 1 | - | 185, 200, 95 | - | 0,19 | - | - |
| 109. | Seskwiterpenoid | 1633± 1 | - | 91, 147, 105 | - | 0,24 | - | - |
| 110. | α-Kadinol | 1643± 1 | 1653 | 91, 95, 161 | - | 0,14 | - | - |
| 111. | Kadalen | 1676± 1 | 1674 | 183, 198, 168 | - | 0,69 | - | - |
| 112. | NN | 1993± 1 | - | 257, 275, 177 | - | 0,29 | - | - |
| 113. | Siarka; S ₈ | 2014± 1 | 2004 | 64, 256, 160 | - | - | 1,04 | - |

* związek pochodzący z zanieczyszczeń w kolumnie lub rozkładu fazy stacjonarnej, I_{exp} - eksperymentalnie wyznaczony indeks retencji, I_{lit} - literaturowy indeks retencji, M1-ZUOK w Knyszynie, M2-ZUOK w Uhowie, M3-ZUOK w Hryniewiczach, M4-ZUiPO w Czerwonym Borze

5. Podsumowanie

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono iż w badanych próbkach środowiskowych, największy procentowy udział w ogólnej liczbie związków organicznych emitowanych przez odcieki składowiskowe mają węglowodory aromatyczne (niemal 30%). Połowę z zidentyfikowanych związków organicznych stanowią węglowodory aromatyczne i związki karbonylowe. Ze względu na szkodliwość zidentyfikowanych związków w wodach odciekowych, konieczne jest monitorowanie ich obecności oraz wykonywanie oznaczeń ilościowych związków potencjalnie niebezpiecznych w próbkach odcieków. Ponadto należy prowadzić systematyczne kontrole obecności tych związków w środowisku wodno-gruntowym znajdującym się pod składowiskiem, a także podjąć próbę oszacowania ryzyka środowiskowego z nimi związanego.

Literatura

1. Sizirici B., Tansel B. *Projection of landfill stabilization period by time series analysis of leachate quality and transformation trend of VOCs*, Waste Management, 30 (2010), s. 82-91
2. Zou S.C., Lee S.C., Chan C.Y., Ho K.F., Wang X.M., Chan L.Y., Zhang Z.X. *Characterization of ambient volatile organic compounds at a landfill site in Guangzhou, South China*, Chemosphere, 51 (2003), s. 1015-1022
3. Ustawa z dnia 20 grudnia 2005 r. w sprawie standardów emisyjnych z instalacji (Dz. U. nr 260, poz. 2181)
4. Komilisa D.P., Hamb R.K., Park J.K. *Emission of volatile organic compounds during composting of municipal solid wastes*, Water Research, 38 (2004), s. 1707-1714
5. Nikolaou A.D., Golfinopoulos K.S., Kostopoulou M.N., Kolokythas A.G., Lekkas D.T. *Determination of volatile organic compounds in surface waters and treated wastewater in Greece*, Water Research, 36 (2002), s. 2883-2890
6. Philips M., Cataneo R.N., Condos R., Ring Erickson G.A., Greenberg J., La Bombardi V., Munawar M.I., Tietje O. *Volatile biomarkers of pulmonary tuberculosis in the breath*, Tuberculosis, 87 (2007), s. 44-52
7. Das D., Gaur V., Verma N. *Removal of volatile organic compound by activated carbon fiber*, Carbon, 42 (2004), s. 2949-2962
8. Nadal M., Izda I., Schuhmacher M., Figueras M.J., Domingo J.D. *Health risks of the occupational exposure to microbiological and chemical pollutants in a municipal waste organic fraction treatment plant*, International Journal of Hygiene and Environmental Health, 212 (2009), s. 661-669
9. Turan N.G., Akdemir A., Ergun O.N. *Removal of volatile organic compounds during composting of poultry litter*, Water, Air & Soil Pollution, 184 (2007), s. 1573-2932
10. Pagansa E., Fontb X., Sanchez A. *Emission of volatile organic compounds from composting of different solid wastes: Abatement by biofiltration*, Journal of Hazardous Materials, 131 (2006), s. 179-186
11. Swati M., Rema T., Kurian J. *Hazardous organic compounds in urban municipal solid waste from a developing country*, Journal of Hazardous Materials, 160 (2008), s. 213-219

12. Manfredi S., Tonini D., Christensen T.H. *Contribution of individual waste fractions to the environmental impacts from landfilling of municipal solid waste*, Waste Management, 30 (2010), s. 433-440
13. Statheropoulos M., Agapiou A., Pallis G. *A study of volatile organic compounds evolved in urban waste disposal bins*, Atmospheric Environment, 39 (2005), s. 4639-4645
14. Chiriaca R., Carrec J., Perrodind Y., Finec L., Letoffe J.M. *Characterization of VOCs emitted by open cells receiving municipal solid waste*, Journal of Hazardous Materials, 149 (2007), s. 249-263
15. Huang S., He S., Xu H., Wu P., Jiang R., Zhu F., Luan T., Ouyang G., *Monitoring of persistent organic pollutants in seawater of the Pearl River Estuary with rapid on-site active SPME sampling technique*, Environmental Pollution, 200 (2015), s. 149-158
16. Li J., Wang. Y.-B., Li K.-Y., Cao Y.-Q., Wu S., Wu L. *Advances in different configurations of solid-phase microextraction and their applications in food and environmental analysis*, TrAC Trends in Analytical Chemistry, 72 (2015), s. 141-152
17. Inspekcja Ochrony Środowiska, Wojewódzki Inspektorat Środowiska w Białymstoku, *Raport o stanie środowiska województwa podlaskiego w latach 2011-2012*, Biblioteka Monitoringu Środowiska, Białystok 2013
18. Van Den Dool H., Kratz P.D. *A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography*, Journal of Chromatography A, 11 (1963), s. 463-471

Analiza LZO emitowanych z odcieków składowiskowych techniką HS-SPME/GC-MS

Streszczenie

W prezentowanej pracy przedstawiono wyniki analizy jakościowej lotnych i średniolotnych związków organicznych (LZO) w odciekach z czterech składowisk odpadów komunalnych, innych niż niebezpieczne i obojętne, znajdujących się na terenie województwa podlaskiego. Do izolacji analitów wykorzystano technikę mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej z fazy nadpowierzchniowej nad próbką (HS-SPME). Oznaczenia prowadzono techniką chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS). Identyfikację związków prowadzono w oparciu o dwa niezależne parametry – widma mas oraz indeksy retencji. W badanych odciekach zidentyfikowano około 100 lotnych i średniolotnych związków organicznych. Ponad połowę z zidentyfikowanych związków organicznych stanowią węglowodory aromatyczne, związki karbonylowe i terpeny. Znaczącą zawartość zarejestrowano również dla chlorowcopochodnych węglowodorów, węglowodorów alifatycznych, alkoholi i fenoli, kwasów i ich pochodnych, wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych i ich pochodnych oraz związków siarki. Dziesięć związków (aceton, benzen, toluen, p-ksylen, o-ksylen, trichlorometan, 1,2,3-trichlorobenzen, 1,2,3,5-tetrachlorobenzen, disiarczek węgla oraz naftalen) znajduje się na liście substancji, których oznaczenie w środowisku jest zalecane przez Agencję Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych (US EPA), ze względu na ich szkodliwe oddziaływanie na środowisko i zdrowie człowieka. Większość z wymienionych powyżej substancji należy także do priorytetowych zanieczyszczeń US EPA. Są to: benzen, toluen, etylobenzen, trichloroetylen, 1,2,3-trichlorobenzen, 1,2,3,5-tetrachlorobenzen oraz naftalen.

Słowa kluczowe: lotne związki organiczne (LZO), odcieki składowiskowe, mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej (SPME), chromatografia gazowa ze spektrometrią mas (GC-MS)

HS-SPME/GC-MS analysis of volatile organic compounds emitted from the landfill leachates

The paper presents the results of qualitative analysis of volatile and semivolatile organic compounds (VOCs) emitted from the leachate from the four municipal landfills, located in the Podlasie region. For the isolation of analytes solid phase microextraction from headspace above the sample (HS-SPME) was used. The determination was performed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The identification of the compounds based on two independent parameters – the mass spectra and retention indices. In the studied leachate about 100 volatile and semivolatile organic compounds were identified. More than half of the identified organic compounds are hydrocarbons, aromatic carbonyl compounds and terpenes. Significant amounts of chlorinated aromatic and aliphatic hydrocarbons and the aliphatic alcohols, phenols, PAH, acids and its derivatives were also identified. Ten of the detected compounds (acetone, benzene, toluene, p-xylene, o-xylene, trichloromethane, 1,2,3-trichlorobenzene, 1,2,3,5-tetrachlorobenzene, carbon disulfide, and naphthalene) is included in the list of substances which determination in the environment is recommended by the United States Environmental Protection Agency (US EPA) due to harmful effects on the environment and human health. Most of compounds listed below belong also to the US EPA priority pollutants. These are as follows: benzene, toluene, ethyl benzene, trichlorethylene, 1,2,3-trichlorobenzene, 1,2,3,5-naphthalene and tetrachlorobenzene.

Keywords: Volatile organic compounds (VOCs), landfill leachates, solid phase microextraction (SPME), gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

Badania koralowca bambusowego metodą spektroskopii fotoelektronów

1. Wprowadzenie

Rentgenowska Spektroskopia Fotoelektronów (XPS – *X-ray Photoelectron Spectroscopy*), znana również jako Spektroskopia Elektronowa dla celów Analizy Chemicznej (ESCA – *Electron Spectroscopy for Chemical Analysis*) jest powszechnie stosowana do badania składu chemicznego powierzchni. Stosowanie spektroskopii XPS w laboratoriach analitycznych na całym świecie stanowi potwierdzenie Uniwersalności i przydatności tej techniki.

Bardzo ważne z punktu widzenia inżynierii powierzchni są metody takie jak spektroskopia fotoelektronowa XPS. Metoda ta opiera się na wykorzystaniu zjawiska fotoelektrycznego i pozwala badać m. in. energie stanów elektronów wewnątrz atomu [1].

Spektroskopia fotoelektronów wzbudzanych promieniami rentgenowskimi wykorzystuje zarówno monochromatyczną jak i niemonochromatyczną wiązkę promieni rentgenowskich. Jest techniką służącą analizowaniu chemicznej powierzchni materiałów. Przy pomocy tej metody można określać skład pierwiastkowy, wyznaczać wzór empiryczny, stan chemiczny i elektronowy pierwiastków wewnątrz materiału. Widma XPS uzyskiwane są poprzez napromieniowanie powierzchni ciała stałego wiązką promieni rentgenowskich dokonując jednocześnie pomiaru energii kinetycznej promieni rentgenowskich i elektronów, które są emitowane z 1-10 nm górnej warstwy badanego materiału. Widmo fotoelektronów jest rejestrowane poprzez zliczanie wyrzucanych elektronów w zakresie energii kinetycznej elektronów. Charakterystyczne piki obserwowane w widmie są spowodowane zjawiskiem emisji elektronów o określonej energii z atomów. Rejestracja energii i intensywności pików fotoelektronów umożliwia

¹nowakj@kul.pl, Katedra Chemii Fizycznej i Fizykochemicznych Podstaw Inżynierii Środowiska, Instytut Inżynierii Środowiska, Wydział Zamiejscowy Prawa i Nauk o Społeczeństwie, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, www.kul.pl

²nowakd@kul.pl, Instytut Inżynierii Środowiska, Wydział Zamiejscowy Prawa i Nauk o Społeczeństwie, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, www.kul.pl

³mariuszt@kul.pl, Katedra Fizyki Stosowanej, Instytut Inżynierii Środowiska, Wydział Zamiejscowy Prawa i Nauk o Społeczeństwie, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, www.kul.pl

identyfikację i ocenę ilościową wszystkich pierwiastków powierzchni (z wyjątkiem wodoru). W ostatnich latach odnotowano drastyczny wzrost popytu na materiały o wysokich parametrach, co oznacza iż wzrasta znaczenie nauki jaką jest inżynieria materiałów czy inżynieria powierzchni. Tylko zrozumienie oddziaływań fizycznych i chemicznych, które występują na powierzchni lub na granicy dwuwarstw danego materiału pozwala rozwiązać wiele problemów związanych z nowoczesnymi materiałami. Rozwój chemii powierzchni może mieć duży wpływ na takie czynniki jak korozja stopów, aktywność katalityczna, właściwości adhezyjne, zwilżalność, mechanizmy uszkodzeń itd. Powierzchnia materiałów jest miejscem oddziaływania zarówno z otoczeniem zewnętrznym jak również z innymi materiałami. Z tego powodu ważna jest modyfikacja warstwy wierzchniej materiałów w celu poprawy ich właściwości nie zmieniając przy tym materiału. Spektroskopia XPS może być wykorzystywana do analizy składu chemicznego powierzchni materiału po obróbce, takiej jak łamanie, cięcie lub polerowanie. XPS jest podstawowym narzędziem do określenia charakterystyki powierzchni materiałów, począwszy od nieprzywierających powierzchni naczyń, poprzez elektronikę cienkowarstwową a skończywszy na powierzchniach biologicznie aktywnych.

Ogólna charakterystyka powierzchni wprowadza podział materiału na cztery warstwy. Warstwa powierzchniowa jest określana do grubości trzech warstw atomowych (~ 1 nm), w zależności od materiału. Warstwy do około 10 nm są definiowane jako bardzo cienkie folie, a warstwy do około 1 μm jako cienkie folie. Pozostała część ciała stałego jest określana jako materiał wypełniający [2].

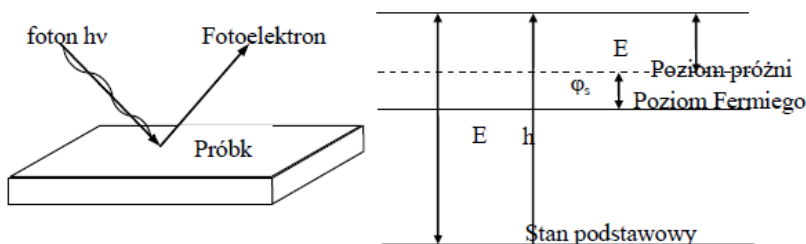
Spektroskopia fotoelektronów XPS stała się ugruntowanym, bardzo ważnym narzędziem analitycznym do bezinwazyjnego badania i określania charakterystyki powierzchni materiałów. XPS dostarcza informacji na temat składu pierwiastkowego oraz struktury chemicznej, a przy pomocy algorytmów matematycznych pozwala oznaczyć kompozycję i grubość cienkich warstw powierzchniowych, jak również skład pierwiastkowy poniżej wierzchniej powierzchni badanego materiału.

Spektroskopii XPS ma swoje początki wraz z rozwojem badań fizyki jądrowej, jednakże dopiero w drugiej połowie XX wieku kiedy to wykazano, że informacje na temat składu chemicznego materiału można uzyskać poprzez pomiar energii kinetycznej elektronów wyemitowanych z próbki przez napromieniowanie jej miękkimi promieniami rentgenowskimi, rozpoczął się burzliwy rozwój spektroskopii fotoelektronów wzbudzanych promieniami rentgenowskimi. XPS jest w wielu przypadkach nieinwazyjną techniką, którą można stosować zarówno w przypadku materiałów przewodzących jak i izolatorów, pozwalającą z wysoką czułością identyfikować skład pierwiastkowy próbek. XPS dobrze nadaje się do badania ilościowego warstw powierzchniowych o grubości w zakresie nanometrów [3].

2. Metoda XPS – podstawy fizyczne

Metoda służąca do uzyskania informacji o właściwościach fizykochemicznych materiału jaką jest rentgenowska spektroskopia fotoelektronów opiera się na znanym powszechnie zjawisku fotoelektrycznym.

Badanie powierzchni za pomocą spektrometru XPS jest realizowane przez napromieniowanie próbki miękkim promieniowaniem rentgenowskim i analizowanie energii zarejestrowanych przez detektor fotoelektronów. Zazwyczaj używanymi w metodzie kwantami promieniowania rentgenowskiego są linie Mg K α (1253.6 eV), Al K α (1486.6 eV) lub monochromatyczny Al K α (1486.7 eV). Zasięg fotonów w ciele stałym zawiera się w przedziale 1-10 mikrometrów. Ich oddziaływanie z atomami w obszarze powierzchni powoduje emisję elektronów co jest tłumaczone przez zjawisko fotoelektryczne [6]. Już na początku XX wieku Albert Einstein w oparciu o podstawowe założenia mechaniki kwantowej wyjaśnił ww. zjawisko. Trafne założenie Einsteina, że światło możemy traktować jako strumień cząstek, których energia jest proporcjonalna do częstości fali świetlnej [4], spowodowało rozwój badań nad wykorzystaniem fotonów o energii z zakresu promieniowania rentgenowskiego w celu wzbudzenia powierzchni próbki. Dało to początek rozwojowi techniki XPS. Na rysunku 1 przedstawiono schemat zjawiska fotoelektrycznego.



Rysunek 1. Zjawisko fotoemisji i schemat poziomów energetycznych

Energię kinetyczną wybitych z powierzchni próbki elektronów można określić za pomocą równania:

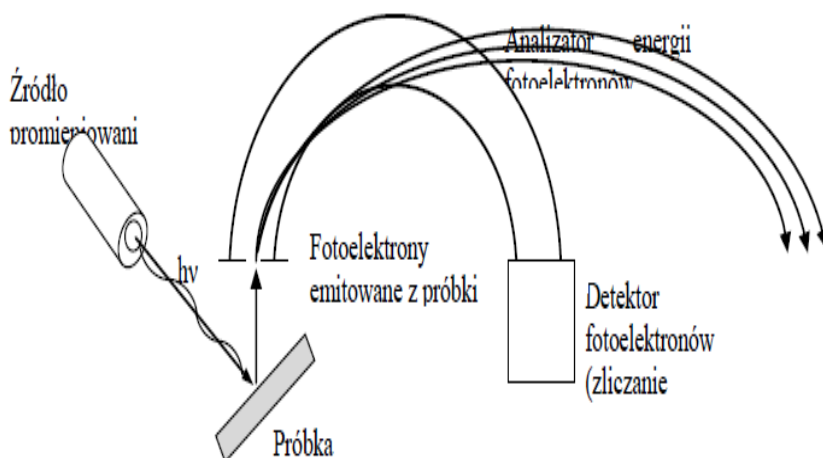
$$E_k = h\nu - E_w - \phi_s \quad (1)$$

gdzie: $h\nu$ – energia fotonu padającego na próbkę, E_w – energia wiązania elektronu w rdzeniu atomowym, ϕ_s – wielkość związana z pracą spektrometru.

Mierząc energię kinetyczną wybitych z próbki fotoelektronów można określić wartość energii wiązania elektronów znajdujących się na poszczególnych powłokach, co pozwala na uzyskanie bardzo ważnych

informacji o badanej próbce [5]. Energię wiązania możemy traktować jako różnicę energii pomiędzy stanem początkowym a stanem końcowym fotoelektronu, który opuścił atom. Ponieważ każdy pierwiastek może mieć przypisaną energię wiązania, metoda XPS może być stosowana do identyfikacji i określania koncentracji pierwiastków w badanej powierzchni. Różnice w energii wiązania pierwiastków wynikają z różnicy w potencjale chemicznym i polaryzowalności związków i mogą one posłużyć do identyfikacji stanu chemicznego analizowanych materiałów [6].

Podstawowymi elementami aparatury do przeprowadzania pomiarów metodą XPS są: układ próżniowy, źródło promieniowania rentgenowskiego, analizator i detektor. Na rysunku 2 przedstawiono uproszczony schemat aparatury do badania XPS.



Rysunek 2. Ogólny schemat aparatury do pomiarów XPS

3. Metoda XPS – zastosowanie

Rentgenowska Spektroskopia Fotoelektronów stanowi potężne narzędzie badawcze. Świadczy o tym ogólnowsiatowe stosowanie metody oraz bardzo duża ilość publikacji odnoszących się do badań w obszernym zakresie fizykochemii powierzchni, co oznacza z kolei, że metoda XPS ma szerokie spektrum zastosowania i jest dominującą techniką badawczą.

Jednym z zastosowań metody XPS jest badanie zmodyfikowanych powierzchni próbek. Pomiar XPS są powszechnie stosowane do kontroli zachowania struktury monomerów podczas modyfikacji plazmowych ze względu na ich wrażliwe powierzchnie. W przypadku polimeryzacji plazmowej cienkich warstw kwasu akrylowego, XPS pozwala wyraźnie odróżnić grupy estrowe od karboksylowych [7].

XPS jest ważną i kluczową techniką służącą określeniu charakteru powierzchni oraz analizie polimerów biomedycznych. Daje możliwość analizy wszystkich pierwiastków (z wyjątkiem wodoru i helu) z powierzchni każdego ciała stałego, który wykazuje stabilność w próżni [8].

Inne zastosowania XPS [9,10]:

- Badanie katalizatorów;
- Oznaczanie zanieczyszczeń znajdujących się na powierzchniach;
- Określanie defektów oraz składu powierzchniowego proszków, włókien, materiałów polimerowych;
- Określanie grubości powłok;
- Otrzymywanie informacji na temat głębokościowej lokalizacji pierwiastków z kilku warstw powierzchniowych;
- Obserwacja zmian zachodzących w składzie chemicznym procesu korozji stopów;
- Badanie wewnętrznej struktury białek;
- Charakteryzacja nanocząstek krzemowych do badań *in vitro* i *in vivo*.

Możliwość oznaczania składu pierwiastkowego oraz stanu chemicznego w warstwach powierzchniowych materiałów powoduje bardzo duże zainteresowanie metodą XPS. Wśród wszystkich znanych współcześnie technik instrumentalnych do analizy powierzchni, XPS jest uznawane za najbardziej ilościową i najbardziej znaczącą w odniesieniu do uzyskiwanych informacji chemicznych.

4. Obiekt badań

Badania przeprowadzono na próbkach koralowców bambusowych pobranych w okolicach Morza Tasmańskiego u wybrzeży Nowej Zelandii przez pracowników instytutu zajmującego się ochroną koralowców z National Institute of Water & Atmospheric Research NIWA w Nowej Zelandii. Następnie fragmenty koralowców zostały pozbawione tkanki okrywającej szkielec, wysuszone i przesłane do dalszych analiz.

Charakterystyczną cechą koralowców bambusowych są naprzemiennie występujące w szkielecie organiczne ciemne i nieorganiczne jasne segmenty, które przypominają swym wyglądem zewnętrznym łodygę bambusa. Kolonie występują najczęściej w postaci rozgałęzionych struktur przypominających krzewy, wachlarze lub małe drzewka i mogą osiągać rozmiary od kilkudziesięciu centymetrów do nawet kilku metrów wysokości. Organizmy te należą do długowiecznych koralowców głębinowych i występują w Oceanie Atlantyckim oraz Indo-Pacyfiku na znacznych głębokościach, często poniżej 800 m [11], gdzie są bardzo istotnym elementem ekosystemów morskich. Największa głębokość na jakiej odnotowano obecność tych koralowców wynosiła 4851m. [12]. Na tak dużych głębokościach nie docierają już promienie słoneczne, a woda jest zimna i ma bardzo małą zawartość tlenu.



Rysunek. 4. Próbką nr. Z9583, współrzędne miejsca pobrania: 48°2,01'S, 166°6,01'E na głębokości 935 m. Zdjęcie wykonane przez autora pracy.



Rysunek. 5. Próbką nr. Z9817, współrzędne miejsca pobrania 34°48.29'S, 171°40,17'E na głębokości 934 m. Zdjęcie wykonane przez autora pracy.

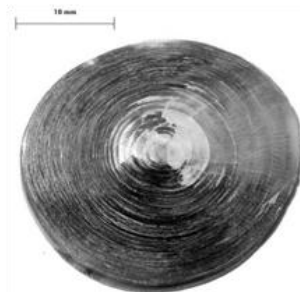
Koralowce bambusowe są geograficznie znacznie bardziej rozprzestrzenione niż ich ciepłolubni tropikalni kuzyni. Należy tu przeszło 150 gatunków z grupy ośmiopromiennych koralowców głębinowych.

Systematyka koralowców bambusowych prezentuje się następująco:

- Królestwo: Zwierzęta (*Animalia*)
- Typ: Parzydełkowce (*Cnidaria*)
- Gromada: Koralowce (*Anthozoa*)
- Podgromada: Ośmiopromienne (*Alcyonaria*)
- Rząd: Gorgonacea
- Podrząd: *Holaxonia*
- Rodzina: Isididae
- Rodzaj: *Keratoisis*

Jednoznaczna klasyfikacja tych koralowców często napotyka jednak na duże trudności [13, 14].

W celu przeprowadzenia pomiarów, fragmenty szkieletu pochodzące z segmentów organicznych fragmenty koralowca pocięto precyzynką z tarczą diamentową chłodzoną wodą w cienkie plastry w cienkie plastry o grubości około 1mm (rys. 6-7). Po wypłukaniu i wysuszeniu poddano próbki analizom instrumentalnym.



Rysunek 6. Plaster przygotowany z próbki nr. Z9583. Zdjęcie wykonane przez autora pracy



Rysunek 7. Plaster przygotowany z próbki nr. Z9817. Zdjęcie wykonane przez autora pracy.

5. Cel pracy

Celem analizy było zbadanie rozmieszczenia przestrzennego pierwiastków w mikrostrukturze szkieletu koralu bambusowego w plastrze przygotowanym z próbki nr Z9583.

6. Aparatura

Do badań wykorzystano aparaturę wchodzącą w skład Laboratorium Międzyuczelnianego w Stalowej Woli, zakupioną w ramach projektu pn. „Utworzenie naukowo-badawczego Laboratorium Międzyuczelnianego w Stalowej Woli” w ramach Programu Operacyjnego Rozwój Polski Wschodniej 2007-2013, Oś Priorytetowa i Nowoczesna Gospodarka, Działanie I.3 Wspieranie Innowacji zgodnie z Umową nr POPW.01.03.00-18-016/12-00”.

Badania wstępne wykonano wysokorozdzielczym skaningowym mikroskopem elektronowym z serii MIRA firmy TESCAN. Mikroskop wyposażony był źródło emisji polowej (ang. *Field Emission Gun*) oraz system zmiennej próżni. Pomiaru prowadzono przy napięciu przyspieszającym 20 kV. Obserwację próbki prowadzono przy użyciu detektora elektronów wstecznie rozproszonych (odbitych) BSE (ang. *Backscattered Electron*) z kryształem YAG (ang. *Yttrium Aluminum Garnet*). Ten rodzaj scyntyлятора ma szereg ważnych zalet, takich jak: niski poziom szumu, wysoką czułość, wyjątkowo krótki czas reakcji, nieograniczony czas życia. Obrazy BSE charakteryzują się mniejszą głębią ostrości i nie oddają dobrze topografii próbki, ale dają informację na temat gęstości obserwowanych powierzchni. Obrazy te pokazują jakościowe zróżnicowanie fazowe/chemiczne powierzchni próbki.

Obok detektora BSE podczas badań użyto systemu mikroanalizy EDS nazywany także EDX (Energy Dispersive X-ray Spectrometer – Spektrometr dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego). Spektrometr ten wykorzystuje jeden z fizycznych efektów oddziaływania wiązki elektronów z próbką w mikroskopie skaningowym, który polega na tym, że atomy próbki wzbudzone elektronami emitują promieniowanie rentgenowskie. Obok promieniowania rentgenowskiego ciągłego, które nie jest wykorzystywane do analizy (stanowi ono tło pomiaru), wzbudzone jest również promieniowanie charakterystyczne. Cechuje je ściśle określona długość fali i wielkość energii, których wartości zależą tylko od rodzaju pierwiastków zawartych w badanej próbce. Wykorzystując energetyczny spektrometr z detektorem półprzewodnikowym można w sposób elektro-niczny na podstawie wielkości energii promieniowania charakterystycznego dokonać jego identyfikacji i pomiaru. Pozwala to z kolei na określenie składu chemicznego analizowanej próbki.

Badania rozkładu pierwiastków wykonano spektrometrem fotoelektronów K-Alpha firmy ThermoScientific. Urządzenie to jest w pełni zintegrowanym, monochromatycznym fotoelektronowym spektrometrem rentgenowskim (system XPS) (Rysunek 3.)

Spektrometr fotoelektronów posiadał monochromator promieniowania rentgenowskiego o rozdzielczość szerokości połówkowej dla maksymalnej wysokości pików (FWHM) energii na Ag 3d_{5/2} : 0,50 eV i 128 kanałowy detektor. Mapy rozkładu pierwiastków wykonano z krokiem 50 mikrometrów. Ze względu na nieprzewodzący charakter próbki wykorzystano system kompensacji ładunku.



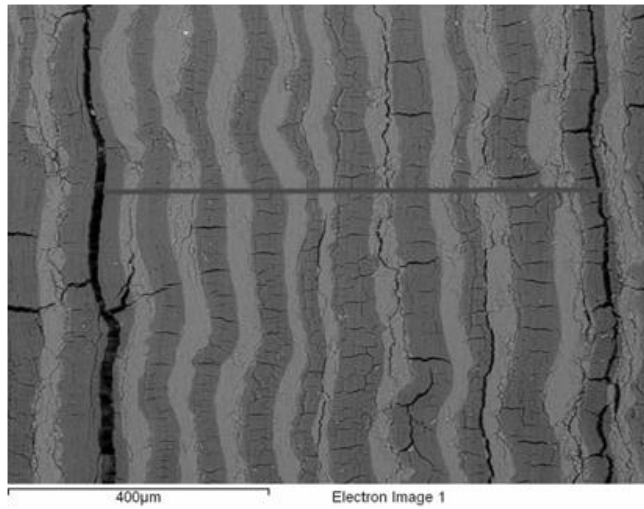
Rysunek 8. Fotografia spektrometru K-Alpha firmy Thermo Scientific znajdującego się w Laboratorium Międzyuczelnianym w Stalowej Woli. Zdjęcie wykonane przez autora pracy

7. Wyniki

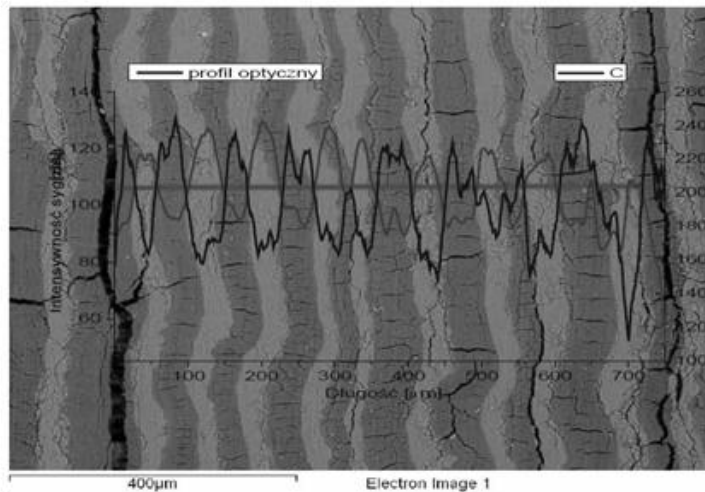
Obserwacje skaningowym mikroskopem elektronowym przy użyciu detektora BSE ujawniły obecnością jasnych i ciemnych pierścieni przyrostów rocznych rozkładających się periodycznie pierścieniowo od środka rdzenia. Przyrosty posiadały zróżnicowaną i nieregularną szerokość (rys. 9).

Wykonane detektorem EDS badania składu wykazały koncentrację węgla w ciemniejszych pierścieniach i wapnia w jaśniejszych. Zestawienie profilu optycznego wyrażającego skalę odcieni szarości z sygnałem węgla zestawiono na rysunku 10. Sygnał optyczny i C są ze sobą odwrotnie skorelowane. Ich szerokość połówkowa wyraża grubość poszczególnych przyrostów. Kolejna ilustracja (rys.11) obrazuje zestawienie sygnału wapnia i sygnału optycznego. Rozłożenie jasnych przyrostów jest doskonale skorelowane z sygnałem tego pierwiastka.

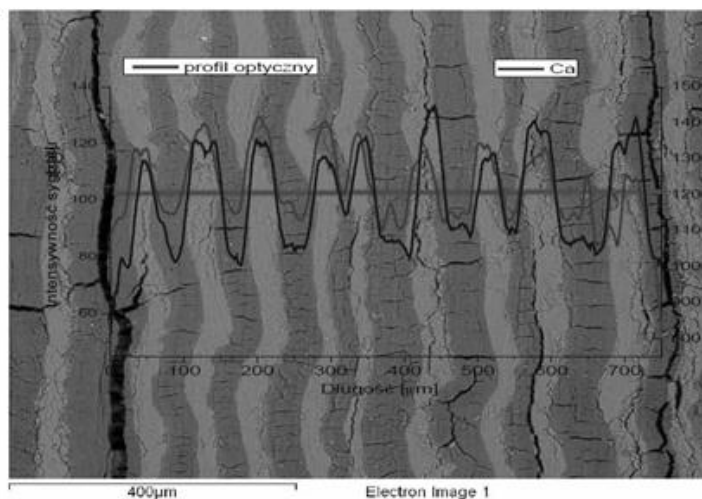
Uzyskane wyniki wskazują na zróżnicowany skład poszczególnych pasm. Pasma jaśniejsze zbudowane są z minerału zawierającego wapń natomiast ciemniejsze prawdopodobnie z bogatej w węgiel warstwy organicznej.



Rysunek 9. Zdjęcie próbki koralowca bambusowego nr. Z9583 wykonane za pomocą mikroskopu elektronowego z widocznymi pierścieniami przyrostów rocznych. Linia szara oznacza linię skanu.



Rysunek 10. Zestawione wyniki z SEM/EDS: kolorem ciemno szarym zaznaczono sygnał chemiczny pochodzący od węgla i zestawiono go z profilem optycznym- linia jasno szara

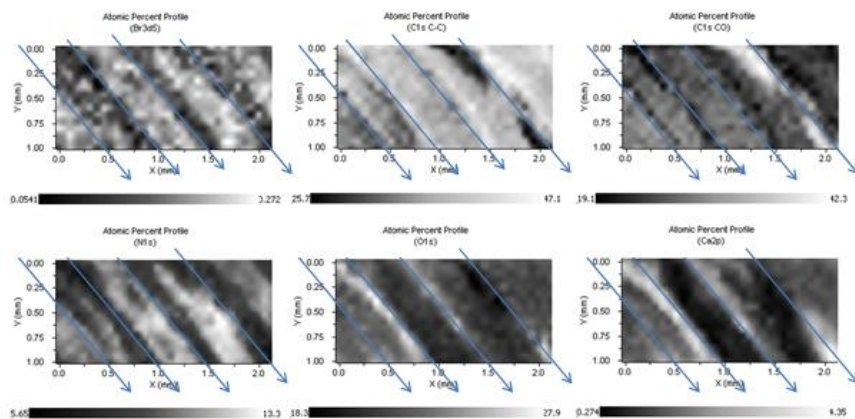


Rysunek 11. Zestawienie wyników z SEM/EDS: kolorem ciemno-szarym zaznaczono sygnał pochodzący od wapnia i zestawiono go z profilem optycznym- jasno-szara linia

Badania przeprowadzone spektrometrem fotoelektronów polegające na wykonaniu map rozkładu pierwiastków na powierzchni koralowca wykazały zróżnicowanie składu i rodzaju występujących związków. Wyniki analizy ilustruje rysunek 12. Do wykonania map wybrano następujące linie: Br 3d₅, C1s C-C, C1s CO, N1s, O1s i Ca2p. W przyrostach organicznych stwierdzono wysoką intensywność sygnałów Br3d₅, N1s, C1s i C1sCO. Może to być związane z występowaniem związków organicznych bogatych w Br i N.

W strefie nieorganicznej występował sygnał Ca2p i O1s. Ich obecność można tłumaczyć występowaniem węglanu wapnia w tej warstwie.

Intensywność sygnału C1s i Ca2p była szczególnie wysoka na granicy między strefą organiczną i nieorganiczną. Może to wynikać z powstawania stref kalcyfikacji na granicy obu warstw.



Rysunek 12. Zestawienie wyników analizy rozkładu energii fotoelektronów na powierzchni koralowca bambusowego wykonanych spektrometrem XPS. Strzałkami zaznaczono granicę przyrostów

8. Podsumowanie

Wykonane badań koralowca bambusowego metodą obrazowania skaningowym mikroskopem elektronowym pozwoliło na identyfikację stref przyrostu koralu oraz określenie składu pierwiastkowego warstw. Analiza grubości warstw przyrostu oraz składu może być pomocna przy badaniach zmian klimatycznych zachodzących w środowiskach morskich. Badania wykonane spektrometrem fotoelektronów XPS pozwoliły zobrazować występowanie pierwiastków i ich stanu chemicznego w obrębie warstw organicznych i mineralnych. Warstwa organiczna bogata była w związki bromoorganiczne i białka natomiast warstwę mineralną tworzył węgiel wapnia. Zaobserwowano występowanie strefy kalcyfikacji między dwoma warstwami utworzoną ze związków organicznych i wapnia.

Literatura

1. <http://home.agh.edu.pl/~tarnawsk/Wyklady/Fizyka%20Atomowa/matdowyl4.pdf> (z dnia 02.04.2016)
2. <http://xpssimplified.com/whatisxps.php> (z dnia 02.04.2016)
3. <http://www.ifb.ethz.ch/corrosion/publications/2004/Spectroscopy> (z dnia 02.04.2016)
4. Bonzel H.P., Kleint Ch., *On the history of photoemission*, Progress in Surface Science, Vol. 49, No. 2., 1995, s. 107-153
5. Turczyniak S., *Rentgenowska spektroskopia fotoelektronów*, Nauka dla Gospodarki nr 2, 2012 s. 205-218
6. Moulder J.F., Stickle W.F., Sobol P.E., Bomben K.D., *Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy*, Physical Electronics, 1995

7. Vohrer U., Hegemann D., Oehr C., *XPS, AES, and AFM as tools for study of optimized plasma functionalization*, *Anal Bioanal Chem* 375, 2003, s. 929-934
8. Andrade J.D., *X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) – chapter in Surface and Interfacial Aspects of Biomedical Polymers*, Plenum Press, 1985, s. 105-195
9. Wagner Johanna M. *X-Ray Photoelectron Spectroscopy*, Nova Science Publishers, Inc. New York 2011
10. Watts John F., Wolstenholme J., *An Introduction to Surface Analysis by XPS and AES*, John Wiley&Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, 2003
11. Etnoyer P, Morgan L, *Habitat-forming deep-sea corals in the Northeast Pacific Ocean*. in Freiwald A, Roberts JM (eds.), *Cold-water corals and ecosystems*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2005, s. 331–343
12. Bayer E.M., Stefani J. *New and previously known taxa of isididocorals (Coelenterata: Gorgonacea), partly from Antarctic waters, with descriptions of new taxa*, *Proceedings of the Biological Society of Washington* 100(4), 1987, s. 937–991
13. Sanchez J.A., Lasker H.R. Taylor D.J., *Phylogenetic analyses among octocorals (Cnidaria): mitochondrial and nuclear DNA sequences (lsu-rRNA, 16S and ssu-rRNA, 18S) support two convergent clades of branching gorgonians*, *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29, 2003, s. 31-42
14. Smith P.J., McVeagh S.M., Mingoia J.T., France S.C., *DNA sequence variation in bamboo corals (Keratoisidinae) in the Southwest and Northwest Pacific Ocean*. *Marine Biology* 144, 2004, s. 253-261
15. France S.C., *Genetic analysis of bamboo corals (Cnidaria: Octocorallia: Isididae): does lack of colony branching distinguish Lepidisis from Keratoisid*, *Bulletin of Marine Science* 81, 2007, s. 323-333

Badania koralu bambusowego metodą spektroskopii fotoelektronów

Streszczenie

W pracy opisano metodę spektroskopii fotoelektronów. Stosując skaningową mikroskopię elektronową z EDS porównano zawartość pierwiastków w strefach przyrostu koralowca. Przeprowadzone badania wykazały zróżnicowany skład warstw przyrostu. Stosując metodę XPS wykonano mapy rozkładu pierwiastków i analizę ich stanu chemicznego obrębie warstw organicznych i mineralnych. Warstwa organiczna bogata była w związki bromoorganiczne i białka natomiast warstwę mineralną tworzył węglan wapnia. Zaobserwowano występowanie strefy kalcyfikacji między dwoma warstwami utworzoną ze związków organicznych i wapnia.

Słowa kluczowe: koral bambusowy, koral zimnowodny, XPS, SEM, EDS

X-ray photoelectron spectroscopic studies of bamboo coral

Abstract

In this paper it was described the method of photoelectron spectroscopy XPS. Using SEM EDS technique it was compared elements content in the growth zones of bamboo coral. The conducted studies have shown a diverse composition of the layers. Using the XPS method were performed elemental and chemical state mapping of organic and mineral layers. The organic layers were rich in proteins and bromoorganic compounds while mineral layers were made mostly of calcium carbonate. Calcification zone was observed between the two layers formed from organic compounds and calcium

Keywords: bamboo coral, cold water corals, XPS, SEM, EDS

Biofilm **– niezwykła społeczność mikroorganizmów**

1. Wprowadzenie

Mikroorganizmy zasiedlają praktycznie wszystkie dostępne im środowiska życia. Można je znaleźć na obszarach wodnych, glebowych oraz w powietrzu. Drobnoustroje kolonizują zarówno abiotyczne elementy środowiska jak i biotyczne, do których należy między innymi człowiek. Ich ilość w organizmie człowieka stanowi ponad dziesięciokrotną liczbę komórek ludzkich, zaś wagowo wynoszą 1,5-2 kilogramów w stosunku do masy ciała dorosłej osoby [1]. Tak duża ilość mikroorganizmów musi mieć ogromny wpływ na organizm człowieka. Niewątpliwie w większości przypadków wywierają pozytywny efekt poprzez wspomaganie trawienia pokarmu, wydzielanie różnego rodzaju substancji działających negatywnie na patogeny ludzkie, działanie jako element systemu odpornościowego. Jednak zdarza się, że mikroorganizmy, które dostają się do organizmu człowieka powodują choroby, czasami bardzo poważne – zagrażające ludzkiemu życiu [2].

Bakterie czy też grzyby bytujące w środowisku jako pojedyncze komórki czy też skupiska luźnych komórek nie są aż tak dużym zagrożeniem, gdyż łatwo jest je zwalczać antybiotykami czy też innymi lekami. Szczególnie problematyczne są te przypadki, w których drobnoustroje mogą tworzyć biofilm. Mikroorganizmy tworzące takiego rodzaju skupiska są chronione przez otaczający je śluz, przez co są bardziej odporne na działanie antybiotyków, ponieważ z trudem docierają one do komórek [3, 4].

Aktualnie poszukuje się leków, które mogłyby skutecznie hamować rozwijanie się biofilmu oraz jednocześnie nie wpływałyby negatywnie na organizm człowieka. Mikroorganizmy tworzące biofilm bardzo szybko uodparniają się na stosowane przeciwko nim leki co sprawia trudność w leczeniu chorób powiązanych z biofilmem.

¹ katarzyna.czerewko@interia.pl, Studenckie Koło Naukowe Biologów UMCS, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

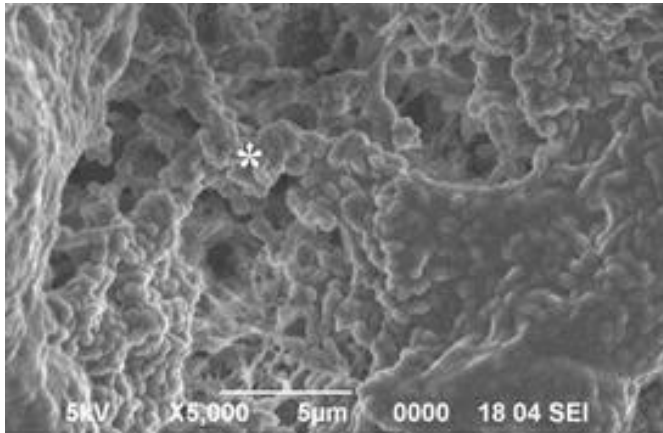
2. Cel pracy

Celem niniejszej pracy było przedstawienie budowy oraz powstawania poszczególnych etapów biofilmu. Na szczególną uwagę zasługują tu molekularne mechanizmy odpowiadające za tworzenie tej struktury, takie jak zjawisko komunikacji między bakteriami – *quorum sensing*. Lepsze poznanie zarówno budowy jak i mechanizmów biorących udział w tworzeniu biofilmu pozwoli na stworzenie bardziej efektywnych środków pozwalających na jego zwalczanie.

3. Charakterystyka biofilmu

3.1. Budowa

Biofilm jest to wielokomórkowa struktura tworzona przez mikroorganizmy zarówno bakterie jak i grzyby. Może on być on złożony z jednego lub wielu gatunków. Skupiska te mogą powstawać na powierzchniach abiotycznych i biotycznych. Biofilm wykazuje adhezję do powierzchni stałych i może tworzyć się na granicy faz, niezależnie od ich rodzaju. Drobnoustroje żyjące w tej społeczności charakteryzują się odmiennym metabolizmem niż te, które funkcjonują jako pojedyncze komórki [6, 7]. Na Rysunku 1 został przestawiony mikroskopowy obraz biofilmu.



Rysunek 1. Zdjęcie struktury biofilmu *Streptococcus mutans* wykonane przy pomocy elektronowego mikroskopu skaningowego (SEM) [5]

Ta niezwykła społeczność mikroorganizmów wydziela na zewnątrz warstwę substancji, która je otacza i chroni przed środowiskiem zewnętrznym, zwaną glikokaliksem. Macierz biofilmu złożona jest z mieszaniny substancji organicznych jak i nieorganicznych, głównie poli-

sacharydów określanych jako polimery wydzielane zewnątrz-komórkowo – EPS (*extracellular polymeric substance*). Udział EPS w tworzeniu biofilmu może wynosić 50-90% materii organicznej. U bakterii Gram ujemnych polisacharydy mają charakter obojętny lub anionowy zaś u bakterii Gram dodatnich posiadają ładunek dodatni. EPS odgrywa bardzo ważną rolę w tworzeniu biofilmu. Najważniejsze funkcje jego składników zostały przedstawione w Tabeli 1 [7].

Tabela 1. Rola poszczególnych elementów EPS w biofilmie

| Składnik EPS | Funkcja |
|--|--|
| Neutralne polisacharydy, białka, DNA | Element konstrukcyjny biofilmu, budowa i stabilizacja jego struktury |
| Hydrofilowe polisacharydy, białka, DNA | Gromadzenie wody – zabezpieczenie przed wysuszeniem |
| Hydrofobowe polisacharydy, białka, DNA | Sorpcja związków organicznych – substancji odżywczych oraz pozyskiwanie ksenobiotyków |
| Polisacharydy, białka, DNA | Adhezja do powierzchni abiotycznych i biotycznych |
| Zewnątrzkomórkowe enzymy | Degradacja substancji złożonych do prostych umożliwiającą pobieranie ich jako substrat pokarmowy |
| | Degradacja polimerów umożliwiającą uwolnienie komórek bakteryjnych z biofilmu |
| DNA | Wymiana materiału genetycznego pomiędzy mikroorganizmami |
| Polimery EPS | Źródło N, P, C |
| Polisacharydy i białka | Bariera ochronna przed czynnikami zewnętrznymi |

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [8, 9]

Oprócz polisacharydów w strukturę biofilmu wchodzi kwasy nukleinowe, białka, lipidy oraz substancje humusowe [6, 7].

Skład i rodzaj biofilmu zależy od różnych czynników takich jak: rodzaj mikroorganizmów, warunki środowiskowe, wiek biofilmu, dostępność pożywienia, a także stężenie tlenu [7].

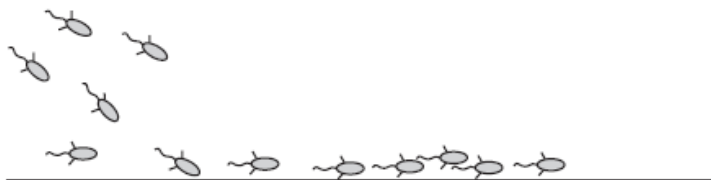
3.2. Etapy tworzenia biofilmu

Jak już wcześniej wspomniano biofilm złożony jest z bardzo dużej liczby mikroorganizmów. Ma on złożoną strukturę i jest otoczony warstwą związków tworzących śluz. Bardzo ważne jest w jaki sposób powstaje biofilm. Tworzenie biofilmu jest procesem wielostopniowym, zależnym od właściwości podłoża, na którym powstaje oraz od właściwości drobno-ustrojów tworzących ten agregat. Istotne funkcje w kształtowaniu biofilmu pełnią także EPS, lipopolisacharydy, fimbrie oraz rzęski. Adhezję ułatwia również chropowata struktura powierzchni i jej wszelkie uszkodzenia [8].

W powstawaniu biofilmu można wyróżnić 4 główne etapy: wstępna adhezja, trwała adhezja, dojrzewanie, uwalnianie komórek [6].

3.2.1. Wstępna adhezja

Wstępna adhezja jest to pierwszy etap tworzenia biofilmu (Rysunek 2). Na początku mikroorganizmy przemieszczają się w kierunku podłoża, na którym chcą się osadzić. Na tym poziomie ważną rolę pełni siła grawitacji, siła hydrodynamiczna, siła termodynamiczna w szczególności ruchu Browna oraz siły van der Waalsa. Pomagają one mikroorganizmom zbliżyć się do docelowej powierzchni. Wstępna adhezja nie zapewnia trwałości biofilmowi, jedynie umożliwia przytwierdzenie komórek do podłoża, które mogą w każdej chwili się od niego odkleić. Na tym etapie jest to adhezja odwracalna i łatwo można usunąć biofilm [9].



Rysunek 2. Wstępna adhezja [9]

3.2.2. Trwała adhezja

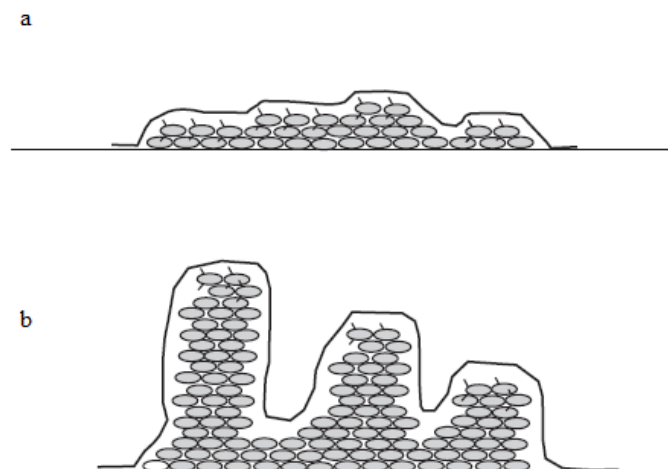
Następną fazą rozwoju biofilmu jest nieodwracalna adhezja. Rozpoczyna się ona w momencie kiedy komórka znajduje się w odległości 1,5nm od powierzchni. Dochodzi do wytworzenia pomiędzy drobnoustrojem, a podłożem charakterystycznych oddziaływań takich jak wiązania wodorowe i oddziaływania elektrostatyczne. Głównie polimery wydzielane zewnątrzkomórkowo umożliwiają tego rodzaju adhezję. Gdy mikroorganizm przytwierdzi się do podłoża zaczyna otaczać się śluzem i intensywnie wydzielać EPS, który pobudza do adhezji inne komórki znajdujące się w pobliżu. Na Rysunku 3 została schematycznie przedstawiona trwała adhezja [9, 10].



Rysunek 2. Nieodwracalna adhezja [9]

3.2.3. Dojrzewanie biofilmu

Kolejnym etapem po trwałej adhezji jest dojrzewanie biofilmu. Zaczynają się tworzyć małe agregaty komórek – mikrokolonie, które następnie będą stanowiły dojrzały biofilm (Rysunek 3a i 3b). Drobnoustroje w biofilmie jak każde inne komórki dzielą się tworząc w ten sposób układ klastrowy [6].



Rysunek 3. a) tworzenie mikrokoloni przez drobnoustroje, wydzielanie zewnątrzkomórkowo EPS i innych polimerów, b) dojrzała postać biofilmu [9]

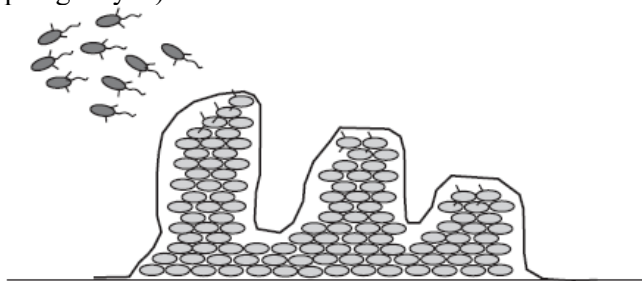
W zależności od gatunku zostają wydzielane charakterystyczne białka adhezyjne i czynniki wspomagające wytworzenie silniejszych oddziaływań. U gronkowców następuje sekrecja polisacharydowej adhezyny międzykomórkowej – PIA (*polysaccharide intercellular adhesin*), czynnika wiążącego – ClfA (*clumping factor A*) oraz białek: SSP1 (*staphylococcal surface protein*), Bap (*biofilm associated protein*) i AAP (*accumulation-associated protein*) [3, 9, 10].

Drobnoustroje stanowiące niższe warstwy biofilmu, stanowiące jego wnętrze, mają bardzo mały dostęp do tlenu, substancji odżywczych. Zaczyna powoli modyfikować się ich metabolizm. Następuje zahamowanie ekspresji genów kodujących niepotrzebne struktury odpowiadające za ruchliwość komórek – rzęsek. Dodatkowo wzrasta aktywność beztlenowych szlaków – fermentacji, denitryfikacji. Zagęszczenie komórek w jednym miejscu jest bardzo duże dlatego ważne jest też aby drobnoustroje zahamowały wydzielanie toksyn oraz enzymów (proteazy, fosfatazy), które mogły by szkodzić swoim sąsiadom. Konsekwencją znajdowania się w społeczności biofilmu jest również zwiększona ekspresja genów odpowiadających za syntezę białek powierzchniowych takich jak Opr C (*outer membrane protein*) czy Opr E (*anaerobically-induced outer membrane porin*), pozwalające na transport zewnątrzkomórkowy substancji produkowanych wewnątrz drobnoustroju. Mikroorganizmy bytujące w zewnętrznych warstwach są bardziej narażone na działanie czynników zewnętrznych niż te, które znajdują się we wnętrzu błony biologicznej [10-12].

Dojrzała forma biofilmu posiada na zewnątrz grubą warstwę glikokaliksu, który umożliwia poprzez adsorpcję pozyskiwanie niezbędnych składników do rozwoju [9, 12].

3.2.4. Dyspersja biofilmu

Uwalnianie komórek z błony biologicznej jest ostatnim etapem w tworzeniu biofilmu (Rysunek 4). Gdy nagromadzenie mikroorganizmów jest tak duża, że przekracza wartość krytyczną następuje powolny rozpad struktury biofilmu. Może to być wynikiem braku substratów pokarmowych lub innych związków niezbędnych do życia. Jest to niezwykle istotny etap w życiu biofilmu, ponieważ oderwane komórki ulegają rozproszeniu i mogą zasiedlać nowe, bardziej przyjazne obszary (bardzo ważny dla organizmów patogennych).



Rysunek 4. Uwalnianie komórek z biofilmu [9]

Początkowo od agregatu komórkowego są odłączane najbardziej peryferyjne warstwy zaś następnie kolejne aż do uwolnienia najbardziej wewnętrznych poziomów. Na nowo zostaje aktywowana ekspresja rzęsek i innych struktur pełniących funkcję motoryczną. Produkowane są również ramnolipidy i enzymy degradujące macierz. Stłumiona natomiast zostaje synteza białek powierzchniowych. U *Pseudomonas fluorescens* i *Pseudomonas aeruginosa* syntetyzowana jest liaza alginianu, u *Escherichia coli* liaza N-acetylo-heparosanu i hialuronidaza u *Streptococcus equi*. Ważną funkcję pełni również dyspersyna B u *Aggregatibacter actinomycetem-comitans*. Powoduje ona rozkład poli- $\beta(1,6)$ -N-acetylo-D-glukozamina (PNAG), głównego polisacharydu tworzącego matrycę biofilmu, który pośredniczy w stabilizacji i adhezji. Pozostałe enzymy biorące udział w degradacji biofilmu zostały przedstawione w Tabeli 2. Mają one zastosowanie jako popularne środki degradujące biofilm w przemyśle spożywczym i medycynie [12-14].

Tabela 2. Przykładowe bakteryjne enzymy zaangażowane w degradację matrycy biofilmu

| Substrat | Enzym | Producent |
|--|----------------|--|
| Alginyan | Liaza algininu | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| Chityna | Chitinaza | <i>Pseudoaltermonas</i> sp. S91 |
| Poli- β (1,6)- <i>N</i> -acetylo-D-glukozamina | Dyspersyna B | <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> |
| Kwas hialuronowy | Hialuronidaza | <i>Streptococcus intermedius</i> |
| Białko LapA (large adhesive protein) | Proteaza LapG | <i>Pseudomonas putida</i> |
| Zewnątrzkomórkowe DNA | Termonukleaza | <i>Staphylococcus aureus</i> |

Źródło: Opracowanie na podstawie [14]

Bakteryjne rozproszenie błony biologicznej można podzielić na trzy zasadnicze fazy: oddzielenie się komórek od struktury biofilmu, przeniesienie do nowego podłoża oraz adhezję do nowego podłoża. W patogenie *Streptococcus mutans*, który jest głównym czynnikiem etiologicznym w powstawaniu próchnicy zębów, komórki odrywają się od płytki nazębnej, trafiają do śliny i przy pomocy wektora mogą kolonizować płytkę nazębną kolejnego zęba. Z kolei bakterie z rodzaju *Legionella* znajdujące się w kroplach skażonej wody mogą być transportowane przy pomocy powietrza do płuc i tam mogą tworzyć nowy biofilm [14].

Wśród mechanizmów rozprzestrzeniania się biofilmu można wyodrębnić dwie główne drogi:

- aktywną – inicjowaną przez same mikroorganizmy,
- pasywną – spowodowaną siłami zewnętrznymi – chemicznymi i fizycznymi, na przykład: zderzenie cząsteczek stałych z błoną biologiczną, wymywaniem cieczą, ingerencja człowieka [14].

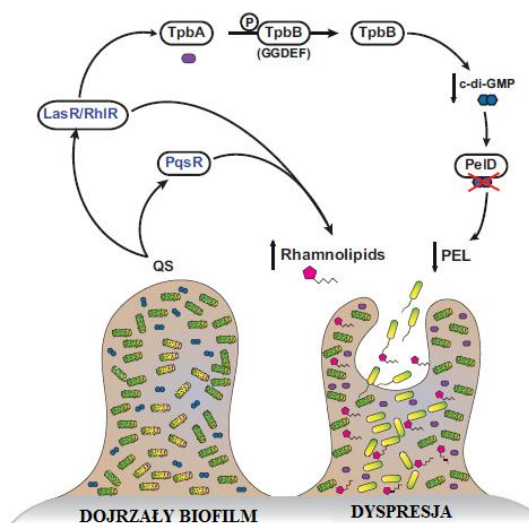
3.3. Sygnalizacja międzykomórkowa w biofilmie

W każdej społeczności mikroorganizmy mogą się porozumiewać poprzez wydzielanie specjalnych czynników. Komunikacja w obrębie gatunków, a także między gatunkami jest niezwykle ważnym aspektem w życiu każdej nawet najmniejszej komórki. W biofilmie na szczególną uwagę zasługuje *quorum sensing* (QS) – zjawisko wyczuwania liczebności działające na poziomie molekularnym. *Quorum sensing* jest to wzajemne komunikowanie się w układzie komórka-komórka poprzez wydzielanie zewnątrzkomórkowych cząstek sygnałowych (autoinduktorów, feromonów) [14, 15]. Najlepiej poznane systemy występują u *Vibrio fischeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora* [16, 17]. Zdolność mikroorganizmów do porozumiewania się w biofilmie sprawia, że zachowują się one jak prymitywny organizm eukariotyczny. QS

kontroluje oprócz tworzenia biofilmu wiele innych procesów – wirulencję, bioluminescencję, ruchliwość, koniugację. Komunikacja może się odbyć jeżeli jedna komórka wytwarza cząsteczkę sygnałową zaś druga posiada receptor dla tej cząsteczki. Jednak pojedyncza cząstka autoinduktora nie wystarczy aby nastąpiło uruchomienie danego procesu. Dopiero po osiągnięciu odpowiedniego stężenia feromonów – kworum, mogą nastąpić zmiany [13, 14].

Międzykomórkowe porozumiewanie się w biofilmie najbardziej obrazowo ukazane jest na przykładzie *Pseudomonas aeruginosa*. *Quorum sensing* bierze udział w każdej fazie tworzenia biofilmu od momentu adhezji aż do dojrzewania. Jednak najważniejszą funkcję pełni w dyspersji biofilmu. *Pseudomonas aeruginosa* posiada dwa tego typu systemy – system *las* wraz z białkami LasR (aktywator transkrypcji genów wirulencji *P. aeruginosa*) i LasI (syntaza laktonu acylo-homoserynowego) oraz system *rhl* zawierający białka RhIR (białko regulujące transkrypcję autoinduktora w odpowiedzi na gęstość komórek *P. aeruginosa*) i RhII (syntaza laktonu acylo-homoserynowego). Oba białka LasI i RhII syntetyzują cząsteczki sygnałowe – LasI – 3-okso-C12-HSL (N-3-oxo-dodecanoyl-L-Homoserine lactone) zaś RhII – C4-HSL (N-butanoyl-l-homoserine lactone). Podczas gdy następuje duże zagęszczenie tych autoinduktorów, receptor LasR przyłącza 3-okso-C12-HSL tworząc kompleks asR-3-okso-C12-HSL. Tak w pełni funkcjonalny kompleks poszukuje promotora na DNA i powoduje ekspresję genów białek sekrecyjnych [13, 17].

Na Rysunku 4 została schematycznie przedstawiona funkcja QS w ostatnim etapie tworzenia biofilmu. *Quorum sensing* reguluje poprzez receptory LasR/RhIR ekspresję TpbA. Aktywny TpbA powoduje defosforylację TpbB. Konsekwencją tego zjawiska jest spadek syntezy c-di-GMP w komórce. Przy małym stężeniu cykliczny 3',5' kwas diguanylowy nie może łączyć się z receptorem PelD. Nieaktywny PelDD nie przyłącza się do PED w związku z tym zostaje zmniejszona produkcja polisacharydu stanowiącego główny budulec macierzy biofilmu. Następuje promowanie wydzielania ramnolipidów, które powodują rozluźnienie struktury biofilmu i stopniowe uwalnianie mikroorganizmów. PqsR (regulator transkrypcji operonu pqsABCDE) również wspomaga aktywację genów kodujących syntezę ramnolipidów [13, 18-20].



Rysunek 4. Rola *quorum sensing* (QS) w biofilmie. LasR/RhlR – receptory, TpbA – fosfataza tyrozynowa, TpbB – cyklaza kwasu diguanylowego, PEL (glucose-rich exopolysaccharide) – egzopolisacharyd bogaty w glukozę, c-di-GMP (cyclic diguanylate monophosphate) – cykliczny 3',5' kwas diguanylowy, PelD – receptor dla c-di-GMP, PqsR- czynnik transkrypcyjny. [13]

4. Podsumowanie

Biofilm stanowi dosyć skomplikowaną strukturę tworzoną przez mikroorganizmy. Bardzo istotna w powstawaniu biofilmu jest komunikacja między poszczególnymi komórkami. Zdolność porozumiewania się stwarza drobnoustrojom możliwość zasiedlenia większej ilości podłoż. Poznanie zarówno mechanizmów komunikacji jak i budowy macierzy biofilmu może przyczynić się w przyszłości do stworzenia leków, które by mogły w sposób nieinwazyjny oraz efektywny hamować rozwój biofilmu już w pierwszych etapach jego tworzenia w organizmie ludzkim.

Literatura

1. http://www.mowimyjak.pl/zdrowie/choroby/ile-bakterii-jest-w-czlowieku,96_3647_4.html
2. Chałas R., Wójcik-Chęcińska I., Woźniak M. J., Grzonka J., Świąszkowski W., Kurzydłowski K. J. *Płytko bakteryjna jako biofilm – zagrożenia w jamie ustnej oraz sposoby zapobiegania*, Postępy Higieny Medycyny Doświadczalnej, 69 (2015), s. 1140-1148
3. Nowak A, Ryski S. *Dwuskładnikowe systemy regulacyjne bakterii Gram-dodatnich i ich rola w tworzeniu biofilmu*, Postępy Mikrobiologii, 51:4 (2012), s. 256-276

4. Haagensen J. A. J., Hansen S. K., Christensen B. B., Pamp S. J., Molin S. *Development of Spatial Distribution Patterns by Biofilm Cells*, Applied and Environmental Microbiology, 81:18 (2015), s. 6120-6128
5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4305086/>
6. O'Toole G. A. *To Build a Biofilm*, Journal of Bacteriology, 185: 9 (2003), s. 2687-2689
7. Vu B., Chen M., Crawford R. J., Ivanova E. P. *Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation*, Molecule, 14 (2009), s. 2535-2554
8. Flemming H. C., Neu T.R., Wozniak T. J. *The EPS Matrix: The "House of Biofilm Cells"*, Journal of Bacteriology, 189:22 (2007), s. 7945-7947
9. Kołzwan B. *Analiza zjawiska biofilmu – warunki jego powstawania i funkcjonowania*, Ochrona środowiska, 33 (4) (2011), s. 3-14
10. Garrett T. R., Bhakoo M., Zhang Z. *Bacterial adhesion and biofilms on surfaces*, Progress in Natural Science, 18:9 (2008), s. 1049-1105
11. Srey S., Jahid I. K., Ha S-D. *Biofilm formation in food industries: A food safety concern*, Food Control, 31:2 (2013), s. 572-585
12. Römling U., Kjelleberg S., Normark S., Nyman L., Uhlin B. E., Åkerlund B. *Microbial biofilm formation: a need to act*, Journal of Internal Medicine, 276:2 (2014), s. 98-110
13. Solano C., Echeverez M., Lasa I. *Biofilm dispersion and quorum sensing*, Current Opinion in Microbiology, 18 (2014), s. 96-104
14. Kaplan J. B. *Biofilm Dispersal*, Journal of Dental Health, 89:3 (2010), s. 205-218
15. Bassler B.L, Miller M. B. *Quorum sensing*, The Prokaryotes, 2013, s. 495-509
16. Bagert J. D, van Kessel J. C., Sweredoski M. J., Feng L., Hess S., Bassler B. L., Tirrell D.A. *Time-resolved proteomic analysis of quorum sensing in Vibrio harveyi*, Chemical Science, 7 (2016), s. 1797-1806
17. Mateńczyk M., Suchowierska M. *Charakterystyka zjawiska quorum sensing i jego znaczenie w aspekcie formowania i funkcjonowania biofilmu w inżynierii środowiska, budownictwie, medycynie oraz gospodarstwie domowym*, Budownictwo i Inżynieria Środowiska, 2:1 (2011), s. 71-75
18. Myszka K., Czaczyk K. *Mechanizm quorum sensing jako czynnik regulujący wirulencję bakterii Gram-ujemnych*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 64 (2010), s. 582-589
19. Dekimpe V., Déziel E. *Revisiting the quorum-sensing hierarchy in Pseudomonas aeruginosa: the transcriptional regulator RhlR regulates LasR-specific factors*, Microbiology, 155 (2009), s. 712-723
20. Husain F.M., Ahmad I., Baig M.H., Khan M.S., Khan M.S., Hassan I., Al-Shabib N.A. *Broad-spectrum inhibition of AHL-regulated virulence factors and biofilms by sub-inhibitory concentrations of ceftazidime*, RSC Advances Issue 33:6 (2016), s. 27952-27962

Biofilm – niezwykła społeczność mikroorganizmów

Streszczenie

Mikroorganizmy są w stanie kolonizować praktycznie wszystkie środowiska życia na Ziemi. Mogą one występować w postaci pojedynczych komórek jak i tworzyć dużą społeczność. Jednym z nich jest biofilm.

Biofilm jest strukturą tworzoną przez mikroorganizmy, które wydzielają na zewnątrz substancje organiczne jak i nieorganiczne. Zapewnia on im przede wszystkim ochronę przed działaniem czynników zewnętrznych oraz zwiększa ich szanse na przeżycie. Bakterie oraz grzyby, które tworzą biofilm mają dużo wolniejszy metabolizm niż wolno żyjące komórki. Biofilm może tworzyć się na różnych powierzchniach zarówno abiotycznych jak i biotycznych. Szczególnie problematyczne jest tworzenie biofilmu przez patogeny wewnątrz organizmu człowieka. Choroby, w których bierze udział biofilm są bardzo ciężkie do wyleczenia. Obecnie naukowcy poszukują coraz to nowszych metod leczenia chorób, w których występuje biofilm. Bardzo ważnym aspektem jest poznanie budowy i etapów powstawania biofilmu. Szczególną uwagę należy zwrócić na molekularne mechanizmy kierujące tym procesem typu *quorum sensing*.

Słowa kluczowe: biofilm, EPS, quorum-sensing

Biofilm – unusual community of microorganisms

Abstract

Microorganisms are able to colonize practically all living environment on Earth. They may occur as single cells and create large community. Some of them is a biofilms.

Biofilms is a structure created by microorganisms that secrete out organic and inorganic substances. It offers them primarily to protect against external aggressions and increases their chances of survival. The bacteria and fungi that form the biofilms have much slower metabolism than slow living cells. Biofilms can create on multiple surfaces both the abiotic and biotic factors. Particularly problematic is the biofilm formation by pathogens inside the human body. The disease, in which participates biofilms are very difficult to treat. Now scientists are looking for more and newer methods of treatment of diseases in which biofilms. Elimination of biofilm is very important for the sake of human health. Currently, researchers are seeking ever newer treatment methods for diseases in which there is a biofilm. A very important aspect is to know the stages of construction and the formation of biofilm. Particular attention should be paid to the molecular mechanisms behind this process, the type of quorum sensing

Keywords: biofilm, EPS, quorum-sensing

Ektoina jako substancja osmoregulacyjna występująca u organizmów metanotroficznych

1. Wprowadzenie

Na drodze ewolucji mikroorganizmy wykształtowały zróżnicowane strategie przetrwania w nieustannie zmieniającym się środowisku. Zmiany ciśnienia osmotycznego środowiska, w którym znajdują się mikroorganizmy mają znaczący wpływ na utrzymanie homeostazy, a w szczególności turgoru komórki. Wewnątrzkomórkowe ciśnienie osmotyczne powinno być z reguły większe niż to w otaczającym je środowisku. Jednak, gdy równowaga ta zostaje zaburzona, wówczas uaktywnione zostają mechanizmy obronne i adaptacyjne komórki.

Najczęstszym powodem zachwiania równowagi osmotycznej jest zwiększone stężenie chlorku sodu środowiska organizmu, które powoduje zwiększenie zewnętrznego ciśnienia osmotycznego, a zatem prowadzi do odwodnienia znajdujących się w nim mikroorganizmów na drodze osmozy. Organizmy zasiedlające środowiska silnie zasolone gromadzą substancje, zwane osmolitami. Te substancje przeciwdziałają wypływowi cząsteczek wody z wnętrza komórki mikroorganizmów. Bakterie mogą nagromadzać osmolity do bardzo wysokich stężeń poprzez syntezę lub też wchłanianie ich ze środowiska. Jednym z adaptacyjnych rodzajów osmolitów jest biosynteza niskocząsteczkowych substancji osmoregulacyjnych, zarówno organicznych i nieorganicznych, należących do grup takich jak sacharydy, alkohole polihydroksylowe, aminokwasy, ektoiny, czy też betainy. Wyróżnia się wśród nich ektoinę i 5-hydroksyektoinę, 5-oksoprolinę, sacharozę, glutaminian, czy też chlorek potasu. Substancje te są rozpuszczalne w wodzie, a ich właściwości fizykochemiczne są kompatybilne z biochemią i fizjologią komórek, w których są wytwarzane. Akumulacja osmolitów przeciwdziała odwodnieniu komórki w warunkach hiperosmotycznych.

Halofilne bakterie metanotroficzne są to mikroorganizmy, które wykorzystują metan, jako źródło węgla organicznego i energii. Zasiedlają one środowiska o szerokim zakresie zasolenia, należą do nich m.in. słone

¹ aleksandra.aniolek@outlook.com, Koło Naukowe Studentów Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Nauk o Środowisku, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, www.kul.pl

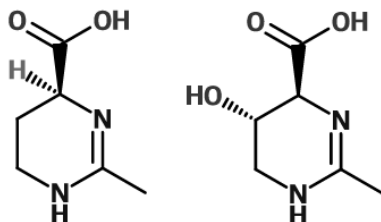
syberyjskie jeziora w Rosji, a także słone rezerwuary wodne na Krymie. W Polsce wyizolowano halotolerancyjne organizmy metanotroficzne w kopalni węgla kamiennego Bogdanka (Lublin) [1]. Organizmy te przeżywają w ekstremalnych warunkach zasolenia sięgającego nawet do 12% NaCl. Ich zdolność do przetrwania łączy się z ich zdolnością do syntezy ektoiny, która ochrania metanotrofy przed szkodliwym działaniem soli.

2. Cel pracy

Celem pracy jest przedstawienie działania ektoiny u mikroorganizmów metanotroficznych. Dokonano analizy działania ektoiny i hydroksyektoiny na wzrost bakterii oraz warunków środowiskowych powodujących wzrost syntezy tych osmotitów u mikroorganizmów.

3. Charakterystyka ektoiny i 5-hydroksyektoiny

Ektoina, czyli kwas 1,4,5,6-tetrahydro-2-metylo-4-pirymidyno-karboksyowy (rys.1), jest cyklicznym aminokwasem określanym, jako kompatybilna substancja rozpuszczona. Jest ona osmoprotektantem syntezowanym przez wiele gatunków bakterii w celu utrzymania homeostazy komórki w ekstremalnych warunkach środowiskowych. Funkcja ektoiny polega na przeciwdziałaniu czynnikom uszkadzającym takim jak nadmierne zasolenie środowiska komórki, bardzo wysoka lub niska temperatura, a także promieniowanie ultrafioletowe. Działanie obejmuje ochronę białek, kwasów nukleinowych, a także całych komórek. Synteza ektoiny aktywowana jest w czasie silnego stresu komórki, szczególnie w przypadku zwiększonego ciśnienia osmotycznego środowiska wskutek działania wysokiego stężenia chlorku sodu. Badania wskazują jednak, że ektoina może być również syntezowana przez mikroorganizmy w odpowiedzi na zwiększoną temperaturę i jest ona czynnikiem ochronnym wobec stresu termicznego [2, 4].



Rys. 1 Chemiczne struktury ektoiny (po lewej) i hydroksyektoiny (po prawej), rysunek własny

Po raz pierwszy ektoinę wyizolował Galiński i współautorzy w roku 1985 u mikroorganizmów z rodzaju *Ectothiorhodospira* [5], które są ekstremofilnymi, halofilnymi, fototroficznymi bakteriami purpurowymi. Odkryli oni również, iż stężenie ektoiny w komórce w środowisku o wysokiej zawartości chlorku sodusięga co najmniej 250mM, czyli około 10% wszystkich osmoprotektantów komórki. W późniejszych latach odkryto, iż spośród organizmów metanotroficznych ektoina jest syntezowana głównie przez ekstremofile z rodzaju *Methylomicrobium*, *Methylobacter*, *Methylophaga* (*Gammaproteobacteria*) [6, 10] oraz *Methylarcula* (*Alphaproteobacteria*).

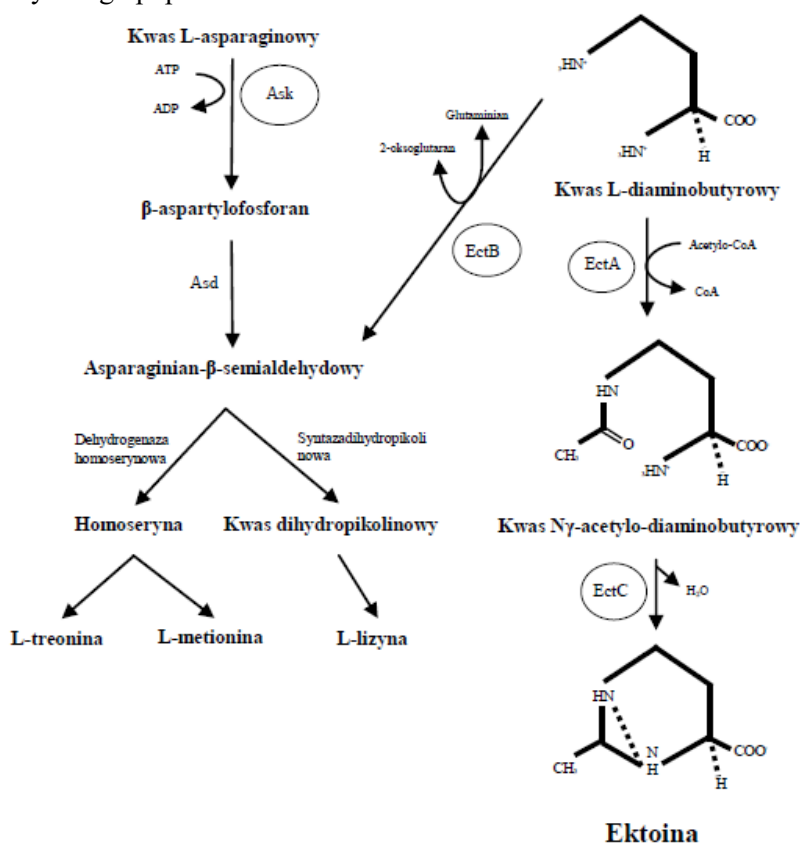
Należy zaznaczyć, iż tylko część mikroorganizmów, które produkują ektoinę mają zdolność do przekształcania jej w 5-hydroksyektoinę na drodze hydroksylacji. Zdolność ta jest uwarunkowana obecnością genu kodującego enzym EctD i dotychczas zidentyfikowano go w 67 gatunkach mikroorganizmów [11]. Z chemicznego punktu widzenia ektoina i hydroksyektoina są bardzo podobne, niemniej jednak ich działanie na struktury komórkowe może się różnić. Podczas gdy ektoina syntezowana jest, jako czynnik ochronny przeciwko zbyt niskiej temperaturze obniżając temperaturę topnienia kwasu deoksyrybonukleinowego, jej pochodna hydroksyektoina ma odwrotne działanie. Reuter i współautorzy [12] stwierdzają, iż hydroksyektoina syntezowana jest przez organizmy narażone na działanie wysokich temperatur gdyż podwyższa ona temperaturę topnienia DNA.

Jak przedstawiono (rys. 2), biosynteza ektoiny odbywa się na drodze metabolicznych przemian aminokwasów asparaginowych i wykorzystuje trzy enzymy: aminotransferazę (EctB), acetylotransferazę (EctA) oraz syntazę ektoinową (EctC) [13]. Enzym EctB jest katalizatorem w reakcji aminowania semialdehydu asparaginy do kwasu diaminobutyrowego (DABA). Przy pomocy enzymu EctA kwas L-diaminobutyrowy jest acetylowany do kwasu N_γ -acetylodiaminobutyrowego, który jest następnie łączony w pierścień przez syntazę ektoinową (EctC), tym samym wytwarzając ektoinę. Hydroksylaza ektoinowa (EctD) to enzym, który katalizuje hydroksylację ektoiny do jej pochodnej, 5-hydroksyektoiny. Podczas hydroksylacji ektoiny następuje dekarboksylacja 2-oksoglutaminianu.

Geny odpowiadające za syntezę ektoiny i hydroksyektoiny są spotykane prawie wyłącznie u organizmów z domeny *Bacteria*. Geny kodujące enzymy syntezujące ektoinę są zorganizowane w operon *ectABC*, a jego transkrypcja jest aktywowana w odpowiedzi na zwiększone stężenie osmotyczne środowiska. Wykazują one wysoki stopień homologii międzygatunkowej, a zgodnie z analizami, co najmniej 30 różnych gatunków bakterii posiada homologi genów *ectABC-ask*. Niemniej jednak, pomimo zbliżonej enzymologii i genetyki syntezy ektoiny przez organizmy

metanotroficzne do innych organizmów, występują między nimi różnice w mechanizmach regulatorowych.

Badania nad genomowym DNA organizmów metanotroficznych wykazały, iż geny te zorganizowane są w operon *ectABC-ask*. Operon ten został zidentyfikowany u sześciu rodzajów mikroorganizmów: *Methylomicrobium*, *Methylobacter*, *Methylophaga*, *Methyloarcula*. Obecność genów kodujących biosyntezę ektoiny koreluje z wykazywaną halotolerancją, a ich homologia wskazuje na wysoki stopień zachowania ewolucyjnego. Oznacza to, iż od wieków mikroorganizmy produkują ektoinę w celu utrzymania turgoru komórki, jako czynnik przeciwdziałający szkodliwemu wpływowi zwiększonego ciśnienia osmotycznego poprzez zasolenie środowiska.



Rys. 2 Schemat biosyntezy ektoiny z kwasu asparaginowego wykonany na podstawie schematu Khmeleniny i współautorów [13]

4. Odpowiedź organizmów metanotroficznych na zasolenie środowiska

4.1. *Methylobacter alcaliphilus* 20Z oraz *Methylobacter modestohalophilus* 10S

W badaniu przeprowadzonym przez Khmeleninę i współautorów [14] zbadano odpowiedź szczepów *M. alcaliphilus* 20Z i *M. modestohalophilus* 10S na zwiększenie zasolenia ich środowiska. Optymalne warunki hodowli wynoszą dla tych gatunków odpowiednio 3% NaCl i pH=9,0 oraz 2% NaCl i pH=6,5. Badane mikroorganizmy hodowane były w różnych stężeniach chlorku sodu w mieszance powietrza i metanu w celu zbadania wpływu stężenia chlorku sodu na biosyntezę ektoiny i 5-oksoproliny, a także sacharozy. Oprócz wymienionych osmoprotektantów wyizolowano również glutaminian, który jak stwierdzono, był produktem rozpadu syntezowanej ektoiny. Wyniki badań przedstawiają się następująco:

Tabela 1. Osmolity u *Methylobacter alcaliphilus* 20Z hodowanego w różnych stężeniach osmotycznych przy pH = 9,0

| NaCl [M] | Zawartość osmolitów [nmol (mg suchej komórki) ⁻¹] | | | Objętość komórki [μl H ₂ O (mg suchej komórki wt.) ⁻¹] |
|----------|---|-----------|---------------|---|
| | Ektoina | Sacharoza | 5-oksoprolina | |
| < 0,07 | 33 | < 0,3 | 38 | 1,6 |
| 0,5 | 448 | 140 | 148 | 1,21 |
| 1 | 842 | 233 | 248 | 1,12 |

Źródło: tabelę przygotowano na podstawie wyników badań Khmeleniny i współautorów [6]

Badanie to wykazało, iż stężenie chlorku sodu ma istotny wpływ na cytoplazmatyczne nagromadzenie ektoiny, 5-oksoproliny i sacharozy (tab. 1) u *M. alcaliphilus* 20Z. Wskazuje to na działanie osmoprotekcyjne tych substancji, w szczególności ektoiny, która w środowisku zawierającym 1,0 M chlorku sodu składała się na aż 60% wszystkich osmolitów. Wykryto, iż objętość komórki wyraźnie spadała wraz ze wzrostem zasolenia środowiska, a całkowite stężenie substancji osmoregulacyjnych obliczono na 0,68M dla 0,5M NaCl i 1,4M dla 1,0M NaCl. Wyprodukowane przez *M. alcaliphilus* 20Z osmolity, powinny więc w pełni równoważyć niekorzystny wpływ chlorku sodu w środowisku, a zatem utrzymywać równowagę osmotyczną komórki tego mikroorganizmu. Zauważono jednak, że ani ektoina ani 5-oksoprolina nie zostały wyizolowane u *M. alcaliphilus* 20Z hodowanego w pożywce z ograniczonym dostępem azotu, co sugeruje, iż związki te mogą być metabolizowane pełniąc funkcje zapasowego źródła azotu.

Tabela 2. Osmolity u *M. modestohalophilus* 10S hodowanego w różnych stężeniach NaCl

| NaCl [M] | Zawartość osmolitów [nmol (mg suchej komórki) ⁻¹] | | |
|----------|---|-----------|---------------|
| | Ektoina | Sacharoza | 5-oksoprolina |
| 0,034 | 11 | 26 | 38 |
| 0,25 | 52 | 33 | 104 |
| 0,5 | 85 | 78 | 124 |
| 1 | 146 | 137 | 178 |

Źródło: tabelę przygotowano na podstawie wyników badań Khmeleniny i współautorów [6]

Badania H-NMR wykazały, iż w wysokich stężeniach chlorku sodu w środowisku *M. modestohalophilus* 10S syntezuje i nagromadza te same substancje osmoregulacyjne, które wyizolowano z *M. alcaliphilus* 20Z. Niemniej jednak różnica między tymi mikroorganizmami polega na ilości wyprodukowanych osmoprotektantów. *M. modestophilus* nagromadzał maksymalnie 500 nmol substancji osmoregulacyjnych, czyli znacząco mniej niż *M. alcaliphilus* 20Z. Dodatkowo, stosunek ilości nagromadzonej ektoiny do pozostałych osmoprotektantów był o wiele niższy.

Z przeprowadzonego badania można wywnioskować, iż w przypadku *M. modestohalophilus* 10S i *M. alcaliphilus* 20Z biosynteza de novo niskocząsteczkowych substancji osmoregulacyjnych takich jak ektoina, sacharoza i 5-oksoprolina zwiększa ich wytrzymałość na skutki podwyższonego stężenia chlorku sodu w środowisku. Można wnioskować, iż ektoina odgrywa największą rolę w osmoregulacji gdyż syntezowana jest przez badane organizmy metanotroficzne w największej ilości. Ektoina i 5-oksoprolina prócz swoich zdolności osmoregulacyjnych mogą również funkcjonować, jako źródło zapasowe azotu.

4.2. Metanotroficzne Konsorcjum Bakteryjne z Polski

W badaniu przeprowadzonym przez Stępniewską i współautorów [1] również wykazano, iż ilość syntezowanej przez bakterie metanotroficzne ektoiny zależy od stężenia chlorku sodu w ich środowisku. Badana była grupa organizmów metanotroficznych pochodzących z Kopalni Węgla Kamiennego Bogdanka zwana Metanotroficznym Konsorcjum Bakteryjnym (MKB). Wzrost bakterii występował w każdym z badanych stężeń chlorku sodu, a optimum hodowli osiągnięto w pożywce bez dodatku chlorku sodu. Jednak biosynteza ektoiny została zaobserwowana tylko w stężeniach od 1-4% chlorku sodu z optimum osiągniętym w 1% NaCl i wynoszącym $1,33 \pm 0,10 \text{ mg gDW}^{-1}$. Badanie potwierdziło zdolność MKB do biosyntezy ektoiny i wskazuje na możliwość wykorzystania tej grupy mikroorganizmów w celach biotechnologicznych.

Należy zaznaczyć, iż dla każdego gatunku optimum to osiąmane jest w innym stężeniu NaCl, a ilość wyprodukowanej ektoiny jest również

zależna od natężenia stresu spowodowanego stopniem zasolenia zewnętrznego komórki. W badaniu Doroniny i współautorów wykazano, iż szczepy *M. alcalica* M8 *M. marina* h1 są zdolne do produkcji aż do 235 mg ektoiny na gDW^{-1} przy 9% stężeniu NaCl [15]. W innym badaniu, przeprowadzonym przez Reshetnikova i współautorów [16] szczepy metanotrofów *M. alcaliphilum* ML1 i *M. thalassica* ATCC 33146 hodowane w 9% NaCl były zdolne do syntezy 230 ± 20 i 200 ± 15 mg gDW^{-1} . Metanotroficzne Konsorcjum Bakteryjne było zdolne do produkcji $1,2 \pm 0,15$ mg gDW^{-1} . Powyższe wyniki wskazują, iż pomimo bardzo zbliżonych szlaków biosyntezy ektoiny każdy gatunek metanotrofów osiąga inny poziom produkcji tego osmolitu. Ma to ogromne znaczenie w procesach biotechnologicznych gdzie wydajność jest jednym z głównych czynników produkcji.

5. Podsumowanie

Jak przedstawiono w tej pracy, ektoina jako substancja osmoregulacyjna odgrywa bardzo ważną rolę w utrzymaniu równowagi osmotycznej komórki w stale zmieniającym się środowisku. Jej synteza inicjowana jest przez ekstremalne warunki środowiskowe, w szczególności w wysokie stężenie chlorku sodu. Ektoina jest ważnym bioprotektantem i tak jak 5-oksoprolina może również odgrywać rolę źródła zapasowego azotu.

Metanotrofy to organizmy zasiedlające ekstremalne środowiska w związku, z czym wiele z nich syntezuje ektoinę w celu przeciwdziałania negatywnym skutkom wysokiego zasolenia środowiska zewnętrznego komórki. Z przedstawionych wyników badań można wywnioskować, iż chlorek sodu obecny w środowisku organizmów metanotroficznych bezpośrednio aktywuje biosyntezę ektoiny i wpływa na jej koncentrację. Wraz ze wzrostem zasolenia środowiska hodowli następuje zwiększenie biosyntezy ektoiny, aż do momentu osiągnięcia optimum po przekroczeniu, którego szkodliwy efekt chlorku sodu nie może już być zrekompensowany.

Literatura

1. Stępniewska Z., Goraj W., Kuźniar A., Pytlak A., Ciepielski J., Frączek P. *Biosynthesis of Ectoine by the Methanotrophic Bacterial Consortium Isolated from Bogdanka Coamine (Poland)*. Applied Biochemistry and Microbiology. 50 (2014), s. 594-600
2. Garcia-Esteva R, Argandona M, Reina-Bueno M, Capote N, Iglesias-Guerra F, Nieto JJ., Vargas C.. *The ectD gene, which is involved in the synthesis of the compatible solute hydroxyectoine, is essential for thermoprotection of the halophilic bacterium Chromohalobacter salexigens*. Journal of Bacteriology 188 (2006), s. 3774-3784

3. Kuhlmann AU, Hoffmann T, Bursy J, Jebbar M, Bremer E. *Ectoine and hydroxyectoine as protectants against osmotic and cold stress: uptake through the SigB-controlled betaine-choline- carnitine transporter-type carrier EctT from Virgibacillus pantothenticus*. J Bacteriol, 193 (2011), s. 4699-4708
4. Bursy J, Kuhlmann AU, Pittelkow M, Hartmann H, Jebbar M, Pierik AJ., Bremer E. *Synthesis and uptake of the compatible solutes ectoine and 5-hydroxyectoine by Streptomyces coelicolor A3(2) in response to salt and heat stresses*. Applied Environmental Microbiology, 74 (2008), s. 7286-7296
5. Galinski E.A., Pfeiffer HP, Truper H.G. *1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid, a novel cyclic amino acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus Ectothiorhodospira*. European Journal of Biochemistry, 145 (1985), s. 135-139
6. Khmelenina V.N., Kalyuzhnaya M.G., Sakharovsky V.G., Suzina N.E., Trotsenko Y.A. *Osmoadaptation in halophilic and alkaliphilic methanotrophs*. Archives of Microbiology, 172 (1999), s. 321-329
7. Doronina N.V., Darmaeva T.D., Trotsenko Y.A. *Methylarcula alcalica sp. Nov., a novel alkaliphilic and moderately halophilic, obligately methylotrophic bacterium from an East Mongolian saline soda lake*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53 (2003), s. 223-229
8. Doronina N.V., Darmaeva T.D., Trotsenko Y.A. *Methylophaga natronica sp. Nov., a new alkaliphilic and moderately halophilic, restricted-facultatively methylotrophic bacterium from soda lake of the Southern Trnsbaikal region*. Systematic and Applied Microbiology, 26 (2003), s. 382-389
9. Kalyuzhnaya M.G., Khmelenina V., Eshinimaev B., Suzina N.E., Nikitin D., Solonin A., Lin JL., McDonald I., Murell C., Trotsenko Y. *Taxonomic characterization of new alkaliphilic and alkalitolerant methanotrophs from soda lakes of the Southeastern Transbaikal region and description of Methylomicrobium buryatense sp. nov.* Systematic and Applied Microbiology, 24 (2001), s. 166-176
10. Kalyuzhnaya M.G., Khmelenina V., Eshinimaev B., Sorokin D., Fuse H., Lidstrom M., Trotsenko Y. *Classification of halo (alkali) philic and halo (alkali) tolerant methanotrophs provisionally assigned to the genera Methylomicrobium and Methylobacter and emended description of the genus Methylomicrobium*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58 (2008), s. 591-596
11. Stępniewska Z., Kuźniar A., Pytlak A., Ciepielski J. *Ektoina – przeciwstresowa cząsteczka przyszłości*. Kosmos, 63 (2014), s. 25-35
12. Reuter K., Pittelkow M., Bursy J., Heine A., Craan T., Bremer E.. *Synthesis of 5-hydroxyectoine from ectoine: crystal structure of the non-heme iron(II) and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase EctD*. PLOS ONE, 5 (2010), s. 1-10
13. Khmelenina V.N., Mustakhimov I.I., Reshetnikov A.S., Kalyuzhnaya M.G., Trotsenko Y.A. *Genetic and Biochemical Aspects of Ectoine Biosynthesis in Moderately Halophilic and Halotolerant Methylotrophic Bacteria*. American Journal of Agricultural and Biological Sciences, 5 (4) (2010), s. 446-458

14. Khmelenina V.N., Kalyuzhnaya M.G., Sakharovsky V.G., Suzina N.E., Trotsenko Y.A., Gottschalk G. *Osmoadaptation in halophilic and alkaliphilic methanotrophs*. Archives of Microbiology, 172 (1999), s. 321-329
15. Doronina, N.V., Darmaeva, T.D., and Trotsenko, Y.A., International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003a, 53: 1, s. 223-229
16. Reshetnikov, A.S., Khmelenina, V.N., Mustakhimov, I.I., Kalyuzhnaya, M., Lidstrom, M., and Trotsenko, Y.A. *Extremophiles*, 15:6, (2011), s. 653-663

Ektoina jako substancja osmoregulacyjna występująca u organizmów metanotroficznych

Streszczenie

Osmolity to grupa związków organicznych wspomagająca utrzymanie homeostazy komórki. Ich działanie polega na regulacji ciśnienia osmotycznego w warunkach stresu komórkowego spowodowanego wysokim zasoleniem środowiska komórki. Związki te utrzymują stabilność wewnętrznego środowiska komórki i zapobiegają uszkodzeniom i utracie funkcji komórek, a także wpływają na poprawne związanie białek.

Ektoina i hydroksyektoina to jedne z częściej spotykanych osmolitów syntezowanych przez organizmy metanotroficzne. Jako bioprotektanty chronią one komórki przed czynnikami uszkadzającymi, takimi jak skrajnie wysokie lub niskie temperatury, odwodnienie czy też promieniowanie UV. Synteza tych osmolitów jest kodowana przez geny zwane *ect* wykazujące wysoką homogenność międzygatunkową. Analizy badań nad mikroorganizmami pokazują, iż co najmniej 30 różnych gatunków bakterii Gram-ujemnych posiada homologiczne geny *ect*, które zorganizowane są w operon *ectABC-ask*.

Celem pracy jest przedstawienie działania osmolitów u mikroorganizmów metanotroficznych. Zaprezentowane zostało działanie ektoiny i hydroksyektoiny na wzrost bakterii oraz przedstawione zostały warunki środowiskowe powodujące indukcję syntezy tych osmolitów.

Słowa kluczowe: metanotrofy, ektoina, osmoregulacja

Ectoine as an osmoregulating substance in methanotrophic bacteria

Abstract

Osmolytes are a group of organic compounds which help to maintain the homeostasis of a cell. They work as agents regulating the osmotic pressure in conditions of cellular stress caused by high salinity of the habitat. These substances maintain the internal stability of a cell and prevent cells from damage and loss of function, as well as help proteins to fold properly.

Ectoine and hydroxyectoine are one of the most commonly found osmolytes synthesized by methanotrophic organisms. As bioprotectants they protect cells from damaging factors such as extremely high or low temperatures, desiccation and UV light. The synthesis of these osmolytes is coded by *ect*-genes which show high homogeneity amongst different species. Analyses of microorganisms show that at least 30 different species of Gram-negative bacteria contain homologous *ect*-genes organized in an *ectABC-ask* operon.

The aim of this work was to show the function of osmolytes in methanotrophic microorganisms. The influence of ectoine and hydroxyectoine on bacterial growth was shown and habitat conditions which induce the synthesis of these osmolytes were presented.

Keywords: methanotrophs, ectoine, osmoregulation

Fitoremediacja gleb skażonych chemicznie

1. Wstęp

Stale wzrastające zanieczyszczenie gleby, powietrza i wód, wynikające z działalności przemysłu, niskiej wydajności metod pozyskiwania metali, chemizacji rolnictwa itp., stanowi istotne zagrożenie dla zdrowia człowieka oraz otaczającej go przyrody [1]. Stąd też konieczne jest nie tylko stworzenie sprawnego systemu monitoringu, ale także opracowanie ekonomicznych i efektywnych technik oczyszczania gleby i unieruchomienie toksycznych związków w miejscu ich depozycji, przeciwdziałających skażeniu środowiska. Istnieje szereg technologii umożliwiających dezaktywację lub usunięcie substancji toksycznych z podłoża, w większości przypadków opartych na metodach ekstrakcji fizyko-chemicznej. Ich zastosowanie wiąże się z niezwykle wysokimi kosztami oraz całkowitą eliminacją występujących w glebie mikroorganizmów. Przywrócenie aktywności biologicznej na tych terenach jest zatem bardzo utrudnione i najczęściej wymaga ponownej interwencji ze strony człowieka. Odbudowa ekosystemów zbliżonych do naturalnych trwa w takich przypadkach niezwykle długo i jest z reguły wysoce kosztowna. Alternatywę dla metod fizyko-chemicznych stanowi fitoremediacja, polegająca na zastosowaniu roślin w procesie obniżania zawartości substancji toksycznych lub w stabilizacji podłoża i hamowaniu procesu erozji, co ogranicza rozprzestrzenianie się zanieczyszczeń poza obszar skażenia. Utrudnienie stanowi tu jednak fakt, że dla prawidłowego rozwoju roślin, zwłaszcza w obrębie siedlisk trudnych, wymagane jest zapewnienie optymalnych właściwości gleb.

Aktywność mikroorganizmów ryzosfery jest jednym z głównych czynników warunkujących wzrost rośliny oraz jej odporność na patogeny. Oddziaływanie mikroorganizmów na korzeń może być negatywne, obojętne lub pozytywne. W szczególności ten ostatni typ interakcji jest

¹ Zakład Mikrobiologii Rolniczej, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy, ul. Czartoryskich 8; 24-100 Puławy, tel. 81 47 86 950, e-mail: agalazka@iung.pulawy.pl

² Zakład Gleboznawstwa Erozji i Ochrony Gruntów, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy, ul. Czartoryskich 8; 24-100 Puławy, tel. 81 47 86 950, e-mail:rgalazka@iung.pulawy.pl

istotny w sytuacjach, gdy poszukuje się możliwości poprawy warunków wzrostu roślin na terenach zdegradowanych lub skażonych przez działalność człowieka. Do najlepiej poznanych grup organizmów ryzosfery należą symbiotyczne bakterie brodawkowe roślin motylkowych [2] oraz drobnoustrojach stymulujących wzrost roślin (*plant growth promoting rhizobacteria and fungi*, PGPR oraz PGPF). Znacznie mniej wiemy o bakteriach wspomagających mykoryzę (*mycorrhizahelperbacteria* MHB) [3].

Związki ropopochodne są zbudowane głównie z węgla i wodoru a tylko część z nich zawiera stosunkowo małe ilości azotu. To powoduje, że w tak skażonej glebie znacznie wzrasta stosunek C:N. Występujący w znacznych ilościach węgiel nie może być w pełni wykorzystany przez mikroorganizmy, ponieważ brak jest dostatecznych ilości azotu i fosforu, niezbędnych do syntezy białka, kwasów nukleinowych i związków wysokoenergetycznych. Jak wiadomo białko, a w tym również kwasy nukleinowe są niezbędnymi składnikami budowy komórki mikroorganizmów. Niedobór tych dwóch istotnych pierwiastków biogenych ogranicza zużywanie węgla jako źródła energii. Wiele badań wskazuje na konieczność uzupełniania niedoboru N i P w skażonej glebie azotem i fosforem. Związki azotu i fosforu dostarcza się najczęściej w postaci roztworu wodnego, stosując perkolację gleby [4-6] lub w postaci powszechnie używanych w rolnictwie mieszanek nawozowych.

Rozwiązaniem tego problemu mogłoby być zastosowanie w procesach bioremediacji szczepów bakterii zdolnych do wykorzystywania WWA jako jedyne źródła węgla a jednocześnie wiążących wolny azot np. asocjacyjnych bakterii z rodzaju *Azospirillum* spp. i/lub symbiotycznych bakterii z rodzaju *Rhizobium* spp. z koinokulacji z grzybami mykoryzowymi. Z uwagi, iż najczęściej degradacja związków ropopochodnych zachodzi sekwencyjnie, przy udziale różnych grup mikroorganizmów współdziałających ze sobą, szczególny nacisk należy położyć na ocenę interakcji tych grup bakterii z grzybami mykoryzowymi opisanymi szeroko w literaturze pod kątem bioremediacji np. pierwiastków śladowych. Określenie synergistycznego oddziaływania z uwzględnieniem optymalnego układu roślina-mikrosymbiony mogłoby stać się początkiem prac nad opracowaniem efektywnego i zarazem ekologicznego kometabolicznego układu oczyszczania gleb skażonych substancjami ropopochodnymi i pierwiastkami śladowymi [7, 8].

2. Fitoremediacja gleb skażonych węglowodorami aromatycznymi i pierwiastkami śladowymi

Strefa korzeniowa roślin jest miejscem charakteryzującym się wysoką aktywnością biologiczną, gdzie jest znacznie wyższa niż w glebie obfitość substratów pierwotnych. Fitoremediacja polega na wykorzystaniu roślin i towarzyszących im mikroorganizmów do oczyszczania skażonej gleby,

stosuje się ją zarówno w przypadku zanieczyszczeń pierwiastkami śladowymi lub związkami organicznymi. Przy stosowaniu tego typu zabiegów bardzo istotne jest jednak dobranie prawidłowej dawki substancji odżywczych zarówno dla wzrostu rośliny jak i znajdujących się w glebie mikroorganizmów. Ich optymalne stężenie zapewnia maksymalną degradację zanieczyszczenia, lecz nie powoduje powstawania toksycznych związków, takich jak na przykład azotyny, czy nitrozoaminy. Obecność takich niebezpiecznych produktów najczęściej wynika z wprowadzenia do gleby nadmiernych ilości azotanów. Przy ograniczonym dostępie tlenu mogą z nich, bowiem powstawać na drodze chemicznej lub biologicznej związki toksyczne [6]. Ponadto optymalne nawożenie, neutralizacja odczynu, nawadnianie oraz zabiegi uprawy mechanicznej gleb mające na celu jej napowietrzenie stanowią elementy metody remediacji gleb skażonych chemicznie (tzw. sanitacja agrotechniczna). Celem tych zabiegów jest stworzenie poprzez zabiegi agrotechniczne najbardziej optymalnych warunków do rozwoju mikroorganizmów glebowych mających zdolność pozyskiwania energii ze związków ropopochodnych.

Fitoremediacja zachodzi najintensywniej w samej ryzosferze. Ryzosfera to obszar najwyższej aktywności biologicznej. Wprowadzenie do gleby – głównie w strefę korzeniową rośliny-mikroorganizmów wykorzystujących węgiel i energię z rozkładu substancji ropopochodnych, w tym węglowo-dorów aromatycznych może zapewnić efektywny przebieg procesu oczyszczania gleb skażonych. Rośliny, które posiadające silnie rozbudowany system korzeniowy mogą sięgać w głąb gleby mogą poprzez ten system korzeniowy objąć większy teren skażonej gleby. Aktywnie rosnące w głąb gleby silnie rozbudowane korzenie roślin mogą objąć swoim zasięgiem większy obszar skażonej gleby. To właśnie w bezpośredniej strefie korzeniowej zaznacza się najwyższa aktywność biologiczna gleby [10, 11]. Dotychczas przeprowadzone badania wskazują, że najefektywniejszą fitoremediację gleby zanieczyszczonej węglowodorami uzyskuje się przy wysiewie traw, ze względu na bardzo rozbudowany, gęsty system korzeniowy. Niemniej jednak w literaturze przedmiotu odnaleźć można prace [4, 7], w których autorzy nie zalecają stosowania wysiewu traw na terenach skażonych chemicznie. Trawy są roślinami wieloletnimi, gdzie podczas ich wzrostu nie stosuje się (lub stosuje w małych ilościach) zabiegów mechanicznych uprawy gleby, co służy zapewnieniu stabilnych i niezakłóconych warunków dla wzrostu bakterii rozkładających te zanieczyszczenia. Niemniej jednak za tezę dotyczącą stosowania traw w fitoremediacji gleb skażonych przemawia fakt, iż mikroorganizmy glebowe bardzo dobrze adaptują się do warunków panujących w glebie a zabiegi uprawowe naruszające strukturę gleby często przekładają się na spadek aktywności biologicznej gleby. W uprawie roślin

z zastosowaniem tzw. siewu bezpośredniego (bez stosowania zabiegów mechanicznych) zaobserwować można bowiem wysoką aktywność biologiczną gleb. Taka nienaruszona struktura gleby prowadzi do wytworzenia charakterystycznego stałego ekosystemu dla wzrostu i rozwoju mikroorganizmów a uprawa mechaniczna często powoduje rozrywanie m.in. strzępek grzybowych i naruszenie przestrzeni powietrzno – wodnych w strukturze gleby.

W procesie fitoremediacji pozytywne efekty można zaobserwować przy zastosowaniu roślin bobowatych jako roślin fitoremediacyjnych. Ostatnio coraz częściej dostarcza się do środowiska alternatywnych do tlenu akceptorów elektronów, co stymuluje beztlenowe procesy rozkładu organicznych zanieczyszczeń. W tych warunkach mikroorganizmy mogą mineralizować większość węglowodorów alifatycznych i aromatycznych. Są one całkowicie lub częściowo degradowane przez bakterie: denitryfikacyjne, redukujące siarczany, żelazo lub molibden oraz przez populacje metanogenne [5]. Bakterie z rodzajów *Azoarcus* (*A. toluvorans*, *A. toluclasticus*, *A. evansii*) *Paracoccus*, *Ochrobactrum*, *Thaurea*, *Burkholderia kururiansis* oraz *Bradyrhizobium* i *Mezorhizobium* mogą rozkładać różne związki benzenowe podczas procesu denitryfikacji [12]. Proces biodegradacji i detoksyfikacji fenoli i trans-dihydrodioli zachodzi równolegle do przemian jakim podlegają siarczany, kwas glukuronowy, glukoza lub ksyloza [13]. Niektóre szczepy bakterii z rodzaju *Pseudomonas* (szczep T i K172) mogą w warunkach beztlenowych utleniać toluen i m-ksylen [14].

Znaczenie roślin w procesie bioremediacji nie ogranicza się tylko do zwiększania ogólnej liczebności i różnorodności mikroorganizmów. Rośliny zmieniają również fizyczne i chemiczne warunki w glebie [15]. Penetracja systemu korzeniowego poprawia stosunki powietrzno – wodne. Uwalniane przez rośliny wydzieliny korzeniowe, działają wiążąco na cząstki glebowe, w wyniku czego tworzą się agregaty istotne dla utrzymania prawidłowej struktury gleby. W procesie utrzymania prawidłowej struktury gleby zaangażowane są także grzyby mykoryzowe i produkowana przez nie substancja białkowa – glomalina [16]. Glomalina jako silnie hydrofobową cząsteczką, która ma duże zdolności zlepiania ze sobą cząstek glebowych, co prowadzi do utworzenia odpowiedniej struktury gruzłkowatej gleby [16]. W ryzosferze zmienia się również pH i stężenie substancji mineralnych. Roślina stwarza, zatem korzystne warunki dla przebiegu procesów biologicznych, przez co stymuluje bioremediację. Stymulacja bioremediacji przez rośliny polega także na selektywnym wzbogacaniu mikroflory korzeniowej zdolnej do degradowania zanieczyszczenia. Uwalniane przez rośliny wydzieliny mogą zawierać oprócz cukrów, aminokwasów itp. również związki wymagające specyficznych

szlaków metabolicznych (np. fenole). Wiele z nich stanowi często naturalne analogi składników zanieczyszczenia, co powoduje, że w glebie selekcjonuje się odpowiednia populacja mikroorganizmów zdolnych do rozkładu tego typu związków. Interakcje pomiędzy rośliną, grzybami mykoryzowymi oraz bakteriami wspomagającymi proces mykoryzacji są istotne dla obydwu partnerów (rośliny i mikrosymbionta), ale zarówno charakter jak i zakres tej symbiozy uzależniony jest nie tylko od genotypu rośliny i grzyba, ale także od wielu biotycznych i abio-tycznych czynników środowiskowych (glebowych), które w pewnych warunkach mogą zmniejszyć korzystne warunki symbiozy, a nawet zmieniać układy symbiotyczne na pasożytnicze [17-19].

Uważa się, że istotne znaczenie w procesie fitoremediacji mogą mieć również enzymy uwalniane do środowiska glebowego po obumarciu rośliny. Do tych enzymów należą dehalogenazy, nitroreduktazy, peroksydazy wykazujące znaczną aktywność katalityczną w stosunku do wielu organicznych składników zanieczyszczenia. Istotne dla oczyszczania gruntów skażonych produktami ropy naftowej są procesy sorpcji [20]. Roślina jest zdolna poprzez system korzeniowy do absorbowania różnych związków organicznych w zależności od ich względnej lipofilności. Pobrany przez roślinę składnik może się akumulować w korzeniu lub może też zostać trwale wbudowany w jej struktury np. ligniny, co stanowi przykład fitostabilizacji zanieczyszczenia.

Znaczna część zaabsorbowanych związków organicznych podlega jednak tylko przemieszczeniu wzdłuż wiązek przewodzących rośliny i zostaje wytranspirowana przez liście. Zmniejsza to stężenie zanieczyszczenia w glebie, ale nie jest to proces korzystny dla środowiska, ponieważ powoduje skażenie atmosfery. Ponadto wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne mogą być wbudowywane w cząsteczki związków humusowych lub też sorbowane przez organiczną część gleby tj. kwasy humusowe [21].

Metody biologiczne z użyciem roślin polegają głównie na: tolerancji dużych stężeń związków toksycznych, pobieraniu, akumulacji i metabolizmie substancji toksycznych w dużych ilościach we własnych organach oraz stabilizacji zanieczyszczenia w glebie bądź przekształceniu substancji toksycznych w środowisku w związki nietoksyczne. Zasadniczo idea użycia roślin do remediacjiskażonego środowiska wykorzystywana była od dawna, jednakże dopiero wiele odkryć w różnych dyscyplinach nauk biologicznych i rolniczych dokonanych w ostatnim czasie pozwoliło na zaoferowanie obiecujących wariantów tej technologii (tab. 1).

Tabela 1. Rodzaje fitoremediacji [6, 15] Table 1. Types of phytoremediation [6, 15]

| Nazwa metody | Mechanizm |
|----------------------------------|---|
| Fitoekstrakcja ciągła indukowana | usuwanie związków organicznych dzięki akumulacji w zbieralnych częściach roślin: - naturalne hiperakumulatory – długi czas akumulacji - zwiększenie pobierania i skrócenie czasu akumulacji dzięki dodawaniu chelatorów |
| Fitodegradacja | rozkład substancji organicznych przez rośliny i związane z nimi mikroorganizmy |
| Ryzofiltracja | usuwanie zanieczyszczeń ze ścieków i środowisk wodnych dzięki absorpcji na korzeniach roślin |
| Mykoryzoremediacja | udział grzybów mykoryzowych w procesie fitoremediacji gleb skażonych |
| Fitostabilizacja | użycie roślin w celu unieruchomienia zanieczyszczeń w glebie i zmniejszenia ich dostępności w środowisku |
| Fitoewaporacja | przeprowadzenie zanieczyszczeń w stan lotny |
| Fitostymulacja | stymulacja przez rośliny naturalnie występujących procesów degradacji mikrobiologicznej w ryzosferze |
| Epuwalizacja | połączenie filtracji korzeniowej z bioremediacją; rośliny korzystają ze związków mineralizowanych przez bakterie – zwiększenie produkcji biomasy roślinnej |
| Ryzodegradacja | degradacja zanieczyszczeń organicznych w strefie korzeniowej roślin przez bakterie endofityczne |

Wśród najczęściej branych pod uwagę praktyk bioremediacyjnych na szczególną uwagę zasługują fitostabilizacja, fitodegradacja i fitoekstrakcja.

Fitostabilizacja (gr. *phyto* – roślina, łac. *remedium* – środek zaradczy) jest procesem, w którym do rekultywacji gleb wykorzystywana jest zdolność zatrzymywania zanieczyszczeń w korzeniach wyselekcjonowanych gatunków roślin. Proces ten zachodzi na drodze adsorpcji na powierzchni korzeni, adsorpcji do ich wnętrza i wytrącenia w strefie korzeniowej. Ponadto już sam system korzeniowy powoduje unieruchomienie gleby i zawartej w niej zanieczyszczeń, uniemożliwiając erozję powietrzną oraz wodną, dzięki czemu zanieczyszczenia nie przemieszczają się do głębszych warstw profilu glebowego[22].

Fitodegradacja obejmuje zróżnicowane procesy metaboliczne roślin oraz towarzyszących im mikroorganizmów, prowadzące do rozkładu związków organicznych, takich jak wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, pestycydy czy substancje wybuchowe. Z kolei fitoekstrakcja bazuje na zdolności roślin do hiperakumulacji metali [23, 24]. Za rośliny przydatne w tym procesie uważa się takie gatunki lub odmiany, które mogą zakumulować ponad 1% określonego metalu w suchej masie części nadziemnej. Takie rośliny uprawiane są na danym terenie, następnie ich części nadziemne są zbierane, suszone i spalane [25].

Istnieje duże zróżnicowanie zarówno między-, jak i wewnątrzgatunkowe w reakcji roślin na zanieczyszczenie. W praktyce wykorzystuje

się głównie gatunki i odmiany roślin gromadzące mniejsze ilości toksycznych substancji, ale tworzące znacznie większą biomasę, jako że ostatecznym kryterium ich przydatności jest ilość zatrzymanych w biomacie rośliny zanieczyszczeń. Obecnie dominują i są rozwijane dwie zasadnicze strategie fitoremediacyjne: indukowana fitoekstrakcja (związki chelatujące) oraz fitoekstrakcja ciągła [26]. W czasie obserwacji stanowisk naturalnych oraz poszukiwań i selekcji odpowiednich roślin przydatnych do fitoekstrakcji najczęściej potencjalnych kandydatów znaleziono w rodzinie [15]: kapustnych (*Brassicaceae*), traw (*Poaceae*) oraz wśród bobowatych (*Papilionaceae*). W rodzinie traw, ze względu na tworzoną biomasę, możemy wymienić: rodzaje: *Festuca*, *Trifolium* oraz *Lolium*, *Panicum*, *Dactylis* [7, 10, 27]. Polskie odmiany z tych rodzajów wykazują zróżnicowanie zarówno w zdolności do pobierania zanieczyszczeń, transportu do części nadziemnych, jak i produkcji biomasy. Obok, gromadzących znaczną biomasę, różnych gatunków *Vicia* sp., i *Pisum arvense* najczęściej ocenianymi fitoremediantami są *Lupinus* sp., gdyż niektóre gatunki gromadzą znaczne ilości biomasy. Ze względów agrotechnicznych i ekonomicznych w pierwszej kolejności oceniane są gatunki wieloletnie, np. *Lupinus polyphyllus* [28].

W literaturze przedmiotu możemy odnaleźć szereg prac dotyczących fitoremediacji gleb skażonych WWA. W pracy Fan i in. [4] użycie *Medicago sativa* L. w remediacji gleb skażonych pirenem pozwoliło na znaczne ograniczenie stężenia węglowodoru w glebie. Znanych jest wiele prac z użyciem życicy trwałej (*Lolium perenne*) jako modelowej rośliny w bioremediacji związków organicznych w glebie [26]. Sverdrup i inni [29] przedstawili efektywny udział trzech gatunków roślin: koniczyny czerwonej (*Trifolium pratense*), życicy trwałej (*Lolium perenne*) oraz gorczycy (*Sinapis alba*) w rozkładzie WWA, gdzie zaobserwowano spadek zawartość sumy 15 WWA w glebie o ok. 70-85%. Równie efektywna w rozkładzie fenantrenu i pirenu okazała się roślina z rodzaju wiechlinowatych *Cynodon dactylon* L. [30]. Zastosowanie w badaniach dotyczących rozkładu WWA na terenach długotrwale skażonych WWA związkami pięciu gatunków roślin: *Panicum bisulcatum*, *Echinogalus crugalli*, *Astragalus membranaceus*, i *Aeschynomene indica* w znacznym stopniu ograniczyło poziom zanieczyszczenia podczas trzymiesięcznego procesu fitoremediacji terenów pokopalnianych w Korei [31]. Z kolei Parrish i in. [22] potwierdzili relacje pomiędzy rozkładem WWA a zastosowaniem nostryka żółtego (*Melilotus officinalis* L.) i kostrzewy łąkowej (*Festuca arundinacea*) w bioremediacji skażonych gleb. Z kolei Chen i inni [27] potwierdzili przy użyciu pirenu znakowanego ¹⁴C stopień jego mineralizacji w ilości 37,7% i 30,4% w glebie z użyciem kostrzewy

łąkowej i trzciny cukrowej odpowiednio w porównaniu do kontroli bez roślin, gdzie mineralizacja przebiegała zaledwie na poziomie ok. 4,3%.

Gałązka i inni [32-34] badali efektywność i znaczenie bakterii ryzosferowych z rodzaju *Azospirillum* i *Pseudomonasstutzeri* w procesie bioremediacji gleb skażonych WWA. Stwierdzono, iż szczepy bakterii z rodzaju *Azospirillum*spp. i *Pseudomonasstutzeri* posiadają geny kodujące enzymy metabolicznego szlaku rozkładu węglowodorów aromatycznych. Dodatkowo mają one zdolność produkcji biosurfaktantów, co w istotny sposób wpływa na zwiększenie biodostępności węglowodorów aromatycznych w procesie biologicznego rozkładu. Ponadto we wszystkich wybranych do badań szczepach *Azospirillum*spp. stwierdzono obecność genu dla nitrogenazy (gen *nifD*), który warunkuje prowadzenie redukcji azotu cząsteczkowego używając WWA jako substratu pierwotnego. Badania dotyczyły inokulacji traw: kostrzewy łąkowej (*Festucapratenensis*) i kupkówki pospolitej (*Dactylisglomerata*) [7, 8].

3. Mikroorganizmy uczestniczące w procesie fitoremediacji

Początkowo nie zwracano uwagi na konieczność uwzględniania mikroorganizmów glebowych w procesie fitoremediacji. Stosowano natomiast substancje wzmagające dostępność związków toksycznych, a tym samym zwiększające akumulację danego związku w roślinach. Dodatkowo podawano nawozy dla zwiększenia biomasy roślin [36], jak również prowadzono selekcję najbardziej wydajnych odmian lub wykorzystywano techniki inżynierii genetycznej. Pod uwagę brano również zdolność roślin do produkcji związków organicznych, wpływających na ryzosferę i udostępniających zanieczyszczenie [37, 38]. Spośród roślin produkujących w ryzosferze znaczne ilości kwasów organicznych zainteresowano się rodzajem *Lupinus*, którego uprawa z powodzeniem może zastąpić stosowanie chemicznych substancji zwiększających dostępność węglowodoru w podłożu. Kolejne lata badań przyczyniły się do potwierdzenia tezy, iż wysoka aktywność mikroorganizmów w glebie stanowi ważny czynnik wpływający na efektywność procesów bioremediacji gleb zanieczyszczonych.

Takie pierwiastki jak Pb, Zn i Cu mogą być także wiązane przez węglany i szczawiany produkowane przez mikroorganizmy. Niezwykle ważne w wiązaniu metali są również grupy funkcyjne zlokalizowane na powierzchni ściany komórkowej mikroorganizmów [39].

W procesach biologicznego usuwania zanieczyszczeń z terenów skażonych wykorzystywane są głównie bakterie i grzyby saprobiotyczne, podczas gdy rola grzybów mykoryzowych jest wciąż niedoceniana. Tymczasem prawidłowo wykształcona mykoryza może zwiększyć

przeżywalność roślin w trudnych warunkach poprzez podniesienie dostępności biogenów, obniżenie stresu związanego z niską dostępnością wody, wzmożenie odporności na patogeny, wzmożenie produkcji fitohormonów oraz poprawę struktury podłoża, co w efekcie może znacznie podnieść efektywność procesu bioremediacji. Liczebność drobnoustrojów heterotroficznych, zdolnych do wykorzystywania węglowodorów jako jedyne źródła węgla i energii jest różna w poszczególnych ekosystemach. Do rozkładu kompleksowych mieszanin tj. ropy naftowej zdolne są mieszane kultury drobnoustrojów (kompleksy mikroorganizmów) o zróżnicowanej aktywności i zdolności do wykorzystania węglowodorów jako źródła węgla i energii. Kometaboliczna degradacja węglowodorów odgrywa bardzo ważną rolę w procesie bioremediacji. Degradowane węglowodory nie stanowią w tym przypadku źródła węgla i energii, są natomiast kosubstratami. Najczęściej degradacja węglowodorów zachodzi sekwencyjnie, przy udziale różnych grup mikroorganizmów współdziałających ze sobą. Syntetyzowane przez poszczególne szczepy enzymy, w reakcjach hydroksylacji, oksydacji, denitryfikacji, dezaminacji, hydrolizy czy acylacji, mogą się wzajemnie uzupełniać w tworzeniu pełnych szlaków mineralizacji zanieczyszczenia.

Obecnie kometabolizm uważa się za jeden z najważniejszych mechanizmów przemian WWA w glebie [12] np. paration jest kometa-bolizowany przez *Pseudomonas stutzeri* do 4 – nitrofenolu i dietylofosforanu a następnie fenol jest wykorzystywany, jako źródło węgla i energii przez *Pseudomonasaeruginosa*. Często, jako kosubstraty dla związków opornych na biodegradację stosuje się fenol lub toluen. Nie oznacza to jednak, że w celu osiągnięcia efektywnego procesu biodegradacji stosować należy jedynie kosubstrat oraz najaktywniejsze szczepy, często koniecznością staje się wprowadzenie prawie nieaktywnej w procesie rozkładu bakterii, która może ułatwić innym gatunkom aktywność enzymatyczną.

Mikroorganizmy biorące udział w procesie bioremediacji możemy podzielić na trzy podstawowe grupy:

- autochtoniczne, których aktywność reguluje się zabiegami technicznymi, tj.: napowietrzanie, dodatek soli biogennych, nawilżanie,
- wyizolowane z gleby i wprowadzone ponownie w dużej biomacie do skażonego miejsca, jako komórki wolne lub immobilizowane na nośnikach stałych,
- przygotowane w postaci preparatów bakteryjnych lub enzymatycznych.

Wśród bakterii wykorzystujących węglowodory jako jedyne źródło węgla i energii można wyróżnić rodzaje: *Aeromonas* sp., *Acinetobacter* sp.,

Alcaligenes sp., *Arthrobactersp.*, *Bacillus* sp., *Micrococcus* sp., *Mycobacterium* sp., *Pseudomonasp.*, *Sphingomonas* sp., *Rhodococcus* sp., *Flavobacterium* sp., oraz *Vibrio* sp. [14, 40] a spośród grzybów rodzaje: *Candida* sp., *Saccharomyces* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp., *Geotrichum* sp. Także wiele rodzajów promieniowców bierze udział w degradacji węglowodorów: *Acinomyces* sp., *Nocardia* sp., *Streptomyces* sp. [22, 41].

Do modelowych mikroorganizmów używanych w procesie bioremediacji możemy zaliczyć np. *Mycobacterium* sp. z rodzaju *Mycobacterium* i *Pseudomonas*. Bakterie z rodzaju *Mycobacterium* [42] szczep PYR-1 rozkładający wszystkie związki 3-, 4- i 5- pierścieniowe WWA z wyjątkiem chryzenu oraz *Mycobacteriumflavescens* i *Mycobacterium* sp. szczep KR2 [40].

W glebach zanieczyszczonych antracenenem, fenantrenem i pirenem jako mikroorganizmy degradujące WWA znane są przede wszystkim bakterie z rodzaju *Pseudomonas* [14, 32] tj.: *Pseudomonas fluorescens*, *-nasstutzeri*, wiążący wolny azot w obecności różnych substratów będących źródłem węgla i energii [7, 33, 34].

Badania dotyczące izolacji i charakterystyki nowych gatunków szczepów zdolnych do wykorzystywania WWA jako jedyne źródła węgla i energii koncentrują się wokół izolacji szczepów bakteryjnych z gleb zanieczyszczonych WWA: *Mycobacteriumcrocium* sp. nov., *Mycobacteriumpallens* sp. nov., *Mycobacterium rutilum* sp. nov., *Mycobacteriumrufum* sp. nov. i *Mycobacterium aromaticivorans* sp. nov. Szczepy te zostały opisane jako nowe gatunki bakterii zdolne do degradacji WWA [12].

Uwagi

Opracowanie wykonano w ramach realizacji zadanie 1.4. Ocena i kształtowanie bioróżnorodności środowiska glebowego oraz aktywności mikrobiologicznej gleb z uwzględnieniem różnych warunków siedliskowych i systemów gospodarowania. Program Wieloletni IUNG-PIB nalata (2016-2020).

Literatura

1. Andreoni V., Gianfreda L. *Bioremediation and monitoring of aromatic-polluted habitats*. Applied Microbiology and Biotechnology, 76 (2007), s. 287-308
2. Biró B., Köves-Péchy K., Vörös I., Takács T., Eggenberger P. Strasser J. *Interrelations between Azospirillum and Rhizobium nitrogen-fixers and arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere of alfalfa in sterile, AMF-free or normal soil conditions*. Applied Soil Ecology, 15 (2000), s. 159-168

3. Meharg A.A., John W.G., Cairney J.W.G. *Ectomycorrhizas – extending the capabilities of rhizosphere remediation?* Soil Biology & Biochemistry, 32 (2000), s. 1475-1484
4. Fan S., Li P., Gong Z., Ren W., He N. *Promotion of pyrene degradation in rhizosphere of alfalfa (Medicago sativa L.)*, Chemosphere 71 (2008), s. 1593-1598
5. Field J. A., Stams A. J. M., Kato M., Schraa G. *Enhanced biodegradation of aromatic pollutants in cocultures of anaerobic and aerobic bacterial consortia*. Antonie van Leeuwenhoek, 67 (1995), s. 47-77
6. Gałązka A. *Przegląd biologicznych metod oczyszczania gleb skażonych wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi*. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych, 535 (2009), s. 103-110
7. Gałązka A., Gałązka R. *Phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils artificially polluted using plant-associated endophytic bacteria and Dactylis glomerata as the bioremediation plant*. Polish Journal of Microbiology, 64 (3) (2015), s. 239-250
8. Gałązka A., Król M., Perzyński A. *The Efficiency of Rhizosphere Bioremediation with Azospirillum sp. and Pseudomonas stutzeri in Soils Freshly Contaminated with PAHs and Diesel Fuel*. Polish Journal of Environmental Studies, 21(2), (2012), s. 345-353
9. Marchenko A.L., Vorobyov A.V., Dyadishev N.R. *Enhanced degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in plant rhizosphere*. In: *Biogeochemical processes and cycling of elements in the environment*. (wyd.) Polish Society of Humic Substances, Wrocław 2001, s. 465-467
10. April W., Sims R. C. *Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil*. Chemosphere, 20 (1990), s. 253-265
11. Huang X.-D., El-Alawi Y., Penrose D. M., Glick B. R., Greenberg B. M. *A multi-process phytoremediation system for removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils*. Environmental Pollution, 130 (2004), s. 465-476
12. Zhong Y., Luan T., Lin L., Liu H., Tam M.F.Y. *Production of metabolites in the biodegradation of phenanthrene, fluoranthene and pyrene by the mixed culture of Mycobacterium sp. and Sphingomonas sp.* Bioresource Technology, 102 (2011), s. 2965-2972
13. Chauhan A., Fazlurrahman B., Oakeshott J.G., Jain R.K. *Bacterial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: strategies for bioremediation*, Indian Journal of Microbiology, 48 (2008), s. 95-113
14. Doong R., Lei W. *Solubilization and mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by Pseudomonas putida in the presence of surfactant*. Journal of Hazardous Materials, 96 (2000), s. 15-27
15. Gao Z.Y., Ling W.T., Wong M.H. *Plant-accelerated dissipation of phenanthrene and pyrene from water in the presence of a nonionic surfactant*, Chemosphere, 63 (2006), s. 1560-1567
16. Gałązka A., Gawryjolek K. *Glomalina – glikoproteina produkowana przez grzyby mykoryzariuskularnej*, Postępy Mikrobiologii, 54(3) (2015), s. 331-343

17. Johnsen A.R., Karlson U. *Diffuse PAH contamination of surface soils: environmental occurrence, bioavailability, and microbial degradation*. Applied Microbiology and Biotechnology, 76 (2007), s. 533-543
18. Abhilash P.C., Srivastava S., Singh N. *Comparative bioremediation potential of four rhizospheric microbial species against lindane*, Chemosphere, 82 (1) (2013), s.56-63
19. Couillerot O., Ramírez-Trujillo A., Walker V., Von Felten A., Jansa J., Maurhofer M., Défago G., Prigent-Combaret C., Comte G., Caballero-Mellado J., Moëgne-Loccoz Z. *Comparison of prominent Azospirillum strains in Azospirillum-Pseudomonas-Glomus consortia for promotion of maize growth*. Applied Microbiology and Biotechnology, 97 (10) (2013), s. 4639-4649
20. Smith M.J., Flowers T.H., Duncan H.J., Alder J. *Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on germination and subsequent growth of grasses and legumes in freshly contaminated soil and soil with aged PAHs residues*, Environmental Pollution, 141 (2006), s. 519-525
21. Parales R.E., Bruce N.C., Schmid A., Wackett L.P. *Biodegradation, Biotransformation, and Biocatalysis (B3)*, Applied Environmental Microbiology, 68 (2002), s. 4699-4709
22. Parrish Y.D., Banks M.K., Schwab A.P. *Assessment of contaminant liability during phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon impacted soil*. Environmental, Pollution, 137 (2005), s. 87-197
23. Rezek J., Wiesche C., Mackova M., Zadrazil Z., Macek T. *The effect of ryegrass (Loliumperenne) on decrease of PAH content in long term contaminated soil*, Chemosphere, 70 (2008), s. 1603-1608
24. Semple K.T., Dew N.M., Doick K.J., Rhodes A.H. *Can microbial mineralization be used to estimate microbial availability of organic contaminants in soil?* Environmental, Pollution, 140 (2006), s.164-172
25. Yu W., Kuang S., Zhao L. *Uptake, accumulation and translocation of polycyclic aromatic hydrocarbons by winter wheat cultured on oily sludge-amended soil*. Chin, J. Geochem, 32 (2013), s. 295-302
26. Liste H.H., Prutz I. *Plant performance, dioxygenase-expressing rhizosphere bacteria, and biodegradation of weathered hydrocarbons in contaminated soil*, Chemosphere, 62 (2006), s. 1411-1420
27. Chen Y.C., Banks M.K. *Bacterial community evaluation during establishment of tall fescue (Festucaarundinacea) in soil contaminated with pyrene*, International Journal of Phytoremediation, 6 (2004), s. 227-238
28. Huang X.D., El-Alawi Y., Penrose D.M., Glick B.R., Greenberg B.M. *Responses of three grass species to creosote during phytoremediation*, Environmental Pollution, 130 (2004), s. 453-463
29. Sverdrup L.E., Krogh P.H., Nielsen T., Kjaer C., Stenersen J. *Toxicity of eight polycyclic aromatic compounds to red clover (Trifoliumpratense), ryegrass (Loliumperenne) and mustard (Sinapsis alba)*, Chemosphere, 53 (2003), s. 993-1003
30. Thompson O.A., Wolf D.C., Mattice J.D., Thoma G.J. *Influence of Nitrogen Addition and Plant Root Parameters on Phytoremediation of Pyrene-contaminated, Soil Water and Air Pollution*, 189 (2008), s. 37-47

31. Li X., Li P., Lin X., Zhang Ch., Lia Q., Gong Z. *Biodegradation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by microbial consortia in soil and slurry phases*, Journal of Hazardous Materials, 150 (2008), s. 21-26
32. Gałązka A., Król M., Perzyński A. *Wpływ wybranych gleb i roślin na liczebność oraz aktywność enzymatyczną drobnoustrojów biorących udział w rozkładzie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) – Część I. Liczebność drobnoustrojów*, Acta Agraria et Silvestria. Series Agraria, 51 (2008), s. 23-39
33. Gałązka A., Król M., Perzyński A. *Wpływ wybranych gleb i roślin na liczebność oraz aktywność enzymatyczną drobnoustrojów biorących udział w rozkładzie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) – Część II. Aktywność enzymatyczna*, Acta Agraria et Silvestria. Series Agraria, 51 (2008), s. 41-54
34. Gałązka A., Król M., Perzyński A. *Zmiany aktywności biologicznej gleb skażonych wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi (WWA) i olejem napędowym (ON) w ryzosferze kukurydzy*, Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych, 535 (2009), s. 111-120
35. Mueller K.E., Shann J.R. *PAH dissipation in spiked soil: impacts of bioavailability, microbial activity and trees*, Chemosphere, 64 (2006), s. 1006-1014
36. Liang Meng L., Qiao M., Peter H. *Phytoremediation efficiency of a PAH-contaminated industrial soil using ryegrass, white clover, and celery as mono- and mixed cultures*, H. Arp. J Soils Sediments, 11 (2011), s. 482-490
37. Khan A.G. *Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation*, Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 18 (2005), 18, pp. 355-364
38. Leglizé P., Alain S., Jacques B., Corinne L. *Adsorption of phenanthrene on activated carbon increases mineralization rate by specific bacteria*, Journal of Hazardous Materials, 151 (2008), s. 339-347
39. Avis T.J., Gravel V., Antoun H., Tweddell R.J. *Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity*, Soil Biology & Biochemistry, 40 (2008), s. 1733-1740
40. Child R., Miller C., Liang Y., Narasimham G., Chatterton J., Harrison P., Sims R., Britt D., Anderson A. *Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading Mycobacterium isolates: their association with plant roots*, Applied Microbiology and Biotechnology, 75 (2007), s. 655-663
41. Boonchan S., Britz M.L., Stanley G.A. *Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial co-cultures*, Applied and Environmental Microbiology, 66 (2000), s. 1007-1019

Fitoremediacja gleb skażonych chemicznie

Streszczenie

Zanieczyszczenie gleb wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi (WWA) stanowi od wielu lat poważny problem środowiskowy. Substancje ropopochodne są główną grupą zanieczyszczeń organicznych w środowisku glebowym. Fitoremediację uważa się za najefektywniejszą metodę degradacji WWA w środowisku glebowym.

Mimo opracowania szeregu metod remediacyjnych, problem bioremediacji zanieczyszczeń organicznych w glebach jest ciągle aktualny. W ostatnich latach w Polsce główne tendencje w badaniach wokół tego tematu skupiają się na zabiegach inżynierskich i biotechnologicznych. Na uwagę zasługują także coraz lepiej poznane wyniki badań z zakresu wykorzystywania technik biologii molekularnej i metod genetycznych w rozkładzie zanieczyszczeń organicznych w glebach. Wiele prac koncentruje się także na izolacji nowych gatunków szczepów bakteryjnych i grzybowych, posiadających zdolności do wykorzystywania substancji ropopochodnych jako jedynego źródła węgla i energii.

Słowa kluczowe: bioremediacja, fitoremediacja, drobnoustroje wspomagające mykoryzę, substancje ropopochodne, pierwiastki śladowe

Phytoremediation of soils contaminated by chemical

Abstract

There are many biological methods of soil reclamation with oil pollution. Bioremediation of PAH's-contaminated sites were largely carried out by the stimulation of microorganisms already present in the contaminated site can of difficulties with bioaugmentation processes. Successful bioaugmentation requires not only acatabolically active inoculum but also a microbial strains or consortium that can survive well in the target environment. PAH's are often presents in a mixture of compounds in the contaminated environments, which leads to various interactions among PAH

mixtures by PAH-degrading bacteria, such as cometabolism, inhibition, induction. Biodegradation by the microbial community is the primary removal mechanisms for PAHs from soil and rhizosphere and bacteria constitute the most important group of soil microbes involved in the biodegradation of PAH's. Phytoremediation (phytoextraction, phyto-stabilization, phytotransformation) use of green plants to bioremediate polluted sites, was found to be a feasible approach for the in situ clean up of the soil surface contaminated with PAH's and diesel fuel. A more rapid biodegradation of PAH's and diesel fuel in the root zone is thus important for improving phytoremediation and bioaugmentation of fuel – polluted field sites.

Keywords: bioremediation, phytoremediation, mycorrhization helper bacteria, PAH's, trace elements

Metoda High Resolution Melting Analysis i jej potencjalne zastosowania w biomedycynie

1. Wprowadzenie

Analiza krzywych topnień w wysokiej rozdzielczości (ang. *High Resolution Melting Analysis*; HRMA) jest stosunkowo nową techniką wynalezioną przez Idaho Technology oraz University of Utah. Jest metodą homogeną, niezwykle czułą, specyficzną, prostą, szybką i co najważniejsze niedestrukcyjną dla DNA. Wykonuje się ją bezpośrednio po amplifikacji badanych fragmentów w PCR. Obecnie istnieje kilka systemów opartych na analizie krzywych topnień. Wszystkie z nich opierają się na podobnych założeniach, choć różnią się rozdzielczością oraz ilością badanych prób możliwych do przeanalizowania w jednym czasie [1]. Najczulszym systemem jest HR-1, jednak pozwala na badanie tylko jednej próby. Najbardziej rozpowszechnionym systemem jest ten dostarczany przez firmę Roche, umożliwiający jednoczesną analizę 32 prób. Stanowi on kompromis pomiędzy bardzo czułym HR-1 a ABI 7700, który bada sekwencję wielu prób w tym samym czasie [2]. Omawiane w niniejszej pracy metody stają się obecnie coraz bardziej popularne i coraz chętniej implementowane w rozwiązaniach, których celem jest m.in. screening molekularny. Dlatego też naszym celem było przybliżenie czytelnikom zasad działania metody HRMA i jej potencjalnych zastosowań w nowoczesnej biomedycynie. Zebrane poniżej informacje są wynikiem analizy najnowszych dostępnych danych literaturowych.

2. Główne założenia HRMA

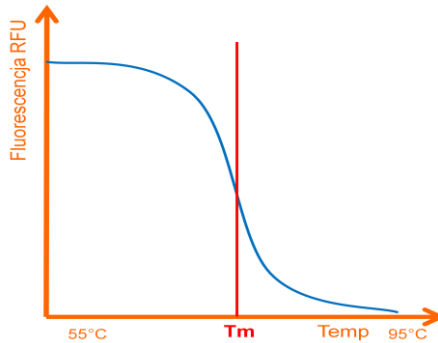
HRMA cechuje się niezwykle prostotą swoich założeń. W głównej mierze polega na wyznaczeniu i porównywaniu ze sobą krzywych topnień DNA. Badany fragment DNA poddaje się amplifikacji w PCR w celu

¹ arkadiusz_goede@wp.pl; Zakład Genoterapii, Wydział Lekarski, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, <http://www.cm.umk.pl>

² m.gawronski@vp.pl; Studenckie Koło Naukowe Terapii Genowej, Zakład Genoterapii, Wydział Lekarski, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, <http://www.cm.umk.pl>

³ kinga.gutowska5@gmail.com; Katedra Biochemii Klinicznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, <http://www.cm.umk.pl>

zwiększenia liczby jego kopii. Analizę HRM przeprowadza się bezpośrednio po PCR. Po reakcji łańcuchowej polimerazy amplikon jest gotowy do analizy bez jakiegokolwiek dodatkowej obróbki, czy modyfikacji. Sama analiza HRM opiera się na stopniowym ogrzewaniu amplikonu od 50°C do 95°C w obecności interkalującego barwnika. Zastosowany barwnik wykazuje fluorescencję tylko w obecności dwuniciowego DNA i pozwala tym samym wykreślić krzywą zależności fluorescencji od temperatury. Stopniowy wzrost temperatury podczas analizy powoduje topnienie DNA. Dwie nici DNA oddysocjują od siebie a barwnik przestaje „świecić”. Widzimy to na wykresie jako spadek poziomu fluorescencji – Rysunek 1. Każda zmiana w strukturze DNA ma wpływ na krzywą topnienia i pozwala rozróżnić poszczególne cząsteczki DNA [3-5].

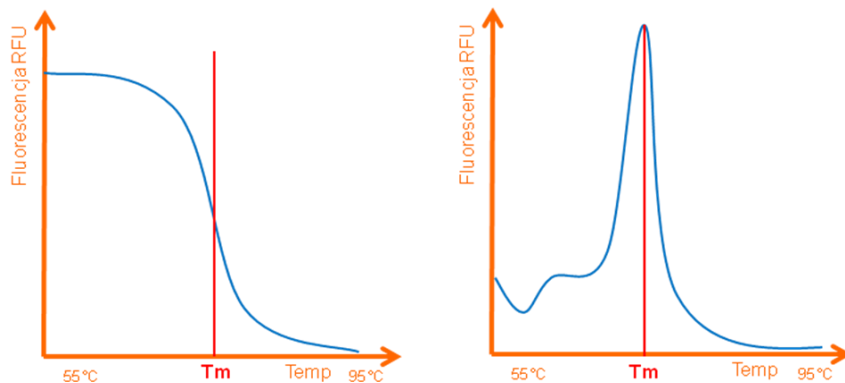


Rysunek 1. Wykres zależności poziomu fluorescencji od temperatury. Kolorem niebieskim zaznaczono krzywą topnienia badanego fragmentu DNA. Linia czerwona wyznacza temperaturę topnienia badanego fragmentu DNA [opracowanie własne]

3. Barwniki stosowane w HRMA

Analiza HRM wykorzystuje barwniki wiążące się z dwuniciowymi cząsteczkami DNA. Barwnik po związaniu z cząsteczką dsDNA wykazuje bardzo dużą fluorescencję, mierzoną w czasie rzeczywistym podczas analizy. Poziom fluorescencji zapisywany jest w postaci krzywej jego zależności od temperatury. Powolne ogrzewanie amplikonu od 50°C do 95°C powoduje rozczepianie cząsteczek dwuniciowego DNA. Barwnik wiążący się wyłącznie z dsDNA oddysocjuje od denaturowanej cząsteczki i przestaje „świecić”. Wraz ze stopniowym wzrostem temperatury liczba dwuniciowych cząsteczek DNA spada na rzecz powiększającej się liczby cząsteczek jednociowych, powstałych jako efekt denaturacji. W ten sposób wzrost temperatury pośrednio przekłada się na spadek poziomu fluorescencji podczas analizy. Spadek poziomu fluorescencji jest największy w temperaturze topnienia (T_m) produktu

PCR. T_m jest definiowana jako punkt na krzywej topnienia, gdzie 50% cząsteczek DNA jest dwuniciowych i 50% cząsteczek DNA jest jednoniciowych. W celu lepszej wizualizacji temperatury topnienia wykreśla się pochodną krzywej topnienia – Rysunek 2. Powstały pik na wykresie pozwala dokładniej określić T_m badanego amplikonu.



Rysunek 2. Porównanie wykresu krzywej topnienia – A z wykresem pochodnej krzywej topnienia – B. Kolorem niebieskim zaznaczono krzywą topnienia oraz pochodną krzywej topnienia badanego fragmentu DNA. Linia czerwona wyznacza temperaturę topnienia badanego fragmentu DNA [opracowanie własne]

Wiązanie się barwnika wyłącznie z dsDNA i wykazywanie znikomej, lub w idealnym przypadku braku fluorescencji w obecności ssDNA jest tylko jednym z kryteriów wyboru barwnika do HRMA. Ważnym jest również, aby w relatywnie wysokiej koncentracji nie hamował reakcji PCR. Zastosowanie zbyt wysokiego stężenia barwnika może stabilizować podwójną nić DNA, wywołując tym samym wzrost temperatury topnienia DNA. Zbyt niska koncentracja barwnika może powodować występowanie niskiego sygnału fluorescencji podczas analizy oraz niedokładność wyników. Dlatego też, w celu osiągnięcia optymalnej koncentracji barwnika, która dawałaby maksymalną fluorescencję, a jednocześnie nie hamowałaby reakcji PCR, ustala się ją w sposób empiryczny wykorzystując miareczkowanie. W tabeli przedstawiono najczęściej stosowane barwniki – Tabela 1 [6-8].

Tabela 1. Najczęściej stosowane barwniki w analizie HRM [opracowanie własne]

| BARWNIK | CHARAKTERYZACJA |
|--------------|--|
| SYBR Green I | pierwsza generacja barwników może hamować PCR w dużym stężeniu możliwe skoki barwnika w nici DNA |
| LC Green | zaprojektowany specjalnie w celu rozpoznawania wariantów DNA podczas HRMA powoduje wzrost temperatury topnienia DNA o 1-3°C |
| SYTO Dye | posiada możliwość samoistnego wnikania do komórek powoduje dużą fluorescencję po związaniu z dsDNA |
| EvaGreen® | nie wzbudza samoistnej fluorescencji nie jest mutageny ani cytotoksyczny nie interkaluje przez błony komórkowe |
| Chromofy | monomeryczny asymetryczny barwnik cyjaninowy często używany podczas analizy metylacji oraz genotypowania SNP |

4. Czynniki wpływające na krzywą topnienia

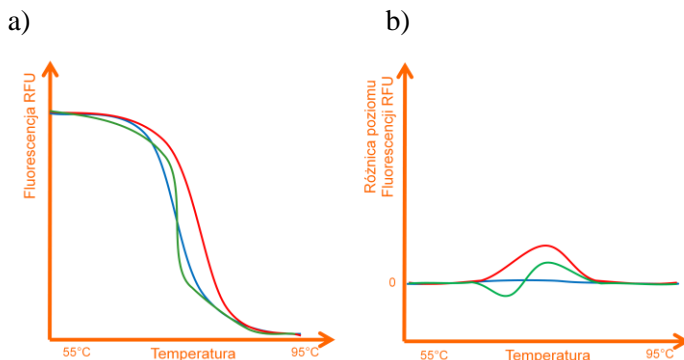
Czynniki wpływające na krzywą topnienia można podzielić na te, dzięki którym możliwe jest rozróżnienie cząsteczek DNA, oraz na te, które w takim rozróżnieniu przeszkadzają poprzez wpływ na stabilność DNA – Tabela 2.

Tabela 2. Czynniki mające wpływ na wykreślanie krzywej topnienia w analizie HRM [opracowanie własne]

| Czynniki umożliwiające rozróżnianie ampliconów | Czynniki mające negatywny wpływ na rozróżnianie ampliconów |
|--|--|
| Stosunek par zasad | Zastosowanie nieodpowiedniego barwnika |
| Komplementarność zasad | Niska jakość DNA |
| Długość nici DNA | Zanieczyszczone reagenty zastosowane podczas PCR |
| | Nieodpowiednie pH |
| | Źle zaprojektowane startery do PCR |

Rozróżnienie poszczególnych wariantów ampliconów odbywa się poprzez porównanie ich temperatur topnienia i kształtu samej krzywej topnienia. Duża zawartość par GC, czy długość DNA wiąże się z istnieniem większej ilości wiązań wodorowych w dwuniciowej cząsteczce DNA zwiększających jej stabilność. Wyższa stabilność

przekłada się natomiast na wyższą temperaturę topnienia badanego ampliconu [3]. Jednakże różnice pomiędzy krzywymi topnień mogą okazać się niezwykle subtelne. W takich przypadkach, by lepiej zobrazować niewielkie zmiany krzywych, odlicza się je od krzywej dla DNA dzikiego – Rysunek 3.



Rysunek 3. **A** – wykres zależności poziomu fluorescencji od temperatury; **B** – wykres poziomu fluorescencji od temperatury odliczany od poziomu fluorescencji dla DNA dzikiego. Kolor niebieski – DNA dzikie, kolor czerwony – homodupleks zmutowany, kolor zielony – heterodupleks zmutowany [opracowanie własne]

4.1. Stężenie soli oraz pH

Czynnikiem najbardziej wpływającym na czułość HRMA, związanym z jakością DNA, jest nadmierne stężenie soli. Niektóre komercyjnie dostępne zestawy do izolacji DNA używają wysokiego stężenia soli (1M) do elucji izolowanego materiału z kolumn lub filtrów. W dużej koncentracji sole te mogą zmienić termodynamikę topnienia cząsteczek DNA i utrudnić tym samym interpretację krzywych topnień podczas analizy HRM. Skrajne wartości pH będące rezultatem używania NaOH w procedurach izolacji DNA mogą również wpływać na analizę poprzez oddziaływanie na stabilność dwuniciowych cząsteczek DNA. W obu wspomnianych przypadkach DNA musi zostać wytrącone a następnie zawieszona w buforze o niskim stężeniu soli jak np. TE przed amplifikacją w PCR. Pomocne może się również okazać samo rozcieńczenie badanych prób [9-11].

4.2. Jakość DNA

DNA o niskiej jakości może produkować podczas amplifikacji niespecyficzne produkty w ostateczności prowadząc do znacznego osłabienia rozdzielczości HRMA, lub nawet do nieprawidłowej analizy krzywych topnień. W celu uzyskania lepszych rezultatów wszystkie analizowane próbki DNA powinny zostać przygotowane wedle tej samej procedury. Ilość

DNA poddawanego amplifikacji również powinna być jednakowa. Ważnym jest również aby analizę HRM wykonać jak najszybciej po PCR, a gdy nie jest to możliwe produkty PCR przechowywać w temp -20°C [9].

4.3. Barwniki nienasycające oraz nasycające

Pierwsza generacja barwników wiążących dsDNA jak na przykład SYBR Green I była barwnikami nienasycającymi. Barwniki takie podczas denaturacji DNA mogą „przeskakiwać” z miejsca już rozszczepionej nici DNA do miejsca, gdzie jest ona jeszcze niezdenaturowana. W takim przypadku korelacja między spadkiem fluorescencji a topnieniem DNA zostaje zaburzona. W przypadku barwników nasycających uwolniony barwnik nie ma możliwości ponownego przyłączenia się do dwuniciowego DNA z powodu jego całkowitego nasycenia barwnikiem [7, 8].

4.4. Projektowanie starterów

Barwniki stosowane podczas analizy HRM wiążą się do wszystkich cząsteczek dwuniciowych w mieszaninie. Dlatego też ważnym jest aby zaprojektować startery do reakcji amplifikacji zapewniające maksymalną wydajność, oraz będące w 100% specyficzne do wybranych regionów okalających amplikon stanowiący analizowany fragment cząsteczki DNA. Najczęściej projektuje się trzy zestawy starterów. Każdą parę bada się pod względem specyficzności, tworzenia niepożądanych starterów-dimerów, lub niespecyficznych produktów i wybiera najbardziej obiecujący zestaw [9, 12].

5. Zastosowania HRMA

5.1. Zastępowanie rozdziału elektroforetycznego

Obecnie w celu badania wszelkich zmian w materiale genetycznym najczęściej wykonuje się rozdział elektroforetyczny na żelu agarozowym lub poliakrylamidowym. W przypadku dużej dostępności badanego DNA i poszukiwania większych zmian w strukturze DNA metoda ta daje dobre rezultaty. Ograniczeniem jednak jest zdolności rozdzielcza żelów w przypadku analizowania niewielkich zmian np. polimorfizmów SNP. Bardzo gęste żele, mające największą zdolność rozdzielczą, są bardzo podatne na uszkodzenia. Nierównomierne usieciowanie w żelu, skoki napięcia czy temperatura powodująca efekt uśmiechu to tylko nieliczne z czynników, które ograniczają możliwość analizy rozdziału elektroforetycznego. Analiza HRM z powodzeniem może zastąpić typowy rozdział elektroforetyczny. Jest metodą znacznie czulszą, szybszą, a wynik jest dużo prostszy do analizy i jednoznaczny. Zmniejszone jest również ryzyko kontaminacji, ponieważ analiza przeprowadzana jest bezpośrednio

po PCR w tej samej próbówce. Materiał genetyczny podczas analizy HRM nie ulega uszkodzeniu i można go później dalej wykorzystać, choćby w celu przeprowadzania innych dalszych analiz. W przypadku odzyskiwania DNA z żelów czy to agarozowych, czy poliakrylamidowych wymagane jest jego oczyszczenie i część DNA ulega utraceniu [13-15].

5.2. Wykrywanie mutacji

Każda zmiana w strukturze DNA ma wpływ na krzywą topnienia i pozwala rozróżnić cząsteczki DNA. W przypadku mutacji w obu allelach danego genu powstaje zmutowany homodupleks. Wygląd jego krzywej topnienia jest podobny do krzywej topnienia dzikiego DNA, jednak sama temperatura topnienia jest inna. Mutacja tylko jednego allela doprowadza to powstania heterodupleksów. Obecność w heterodupleksie niesparowanych zasad osłabia stabilność dwuniciowej cząsteczki DNA. Temperatura topnienia heterodupleksu jest niższa niż dzikiego DNA. Również sam kształt krzywej topnienia znacznie różni się od kształtu krzywej topnienia dla DNA dzikiego [16] – Rysunek 3A.

HRMA jest metodą bardziej czułą dla krótkich fragmentów. Dlatego w przypadku wykorzystania HRMA w celu znalezienia ewentualnych mutacji w wybranym regionie należy go podzielić na fragmenty nie większe niż 300pz. Warto tutaj wspomnieć, iż w istocie badany fragment będzie krótszy o zastosowane startery, których średnio długość wynosi 25 nukleotydów. Zatem wielkość badanego fragmentu nie powinna przekraczać 250pz [17].

HRMA z powodzeniem zastosowano w celu wykrywania mutacji u chorych z nowotworami. Sekwencjonowanie całych genów czy to supresorowych (TP53, BRCA1, BRCA2), czy protoonkogenów (VEGF, EGFR, IGF) w poszukiwaniu przyczyny nowotworu byłoby procesem bardzo skomplikowanym, żmudnym i niezwykle kosztownym. Poprzez zastosowanie HRMA można ograniczyć ilość i wielkość badanych fragmentów, przeznaczonych do ewentualnego sekwencjonowania, ograniczając się tylko do tych sekwencji z wykrytą w HRMA mutacją [1].

HRMA jednak nie ogranicza się tylko do wykrywania mutacji w chorobach nowotworowych [18]. Dzięki analizie krzywych topnień w wysokiej rozdzielczości można diagnozować wiele innych jednostek chorobowych, których powstanie wiąże się z mutacjami w genach. Możemy tutaj wymienić mukowiscydozę, wrodzoną naczyniakowatość krwotoczną, hemofilię czy chorobę Charcota-Mariego-Tootha [1].

Identyfikacja wariantów mitochondrialnego DNA (mtDNA) w jednostkach chorobowych jest niezwykle skomplikowana. Wiele z patologicznych mutacji jest heteroplazmatycznych [19]. Screening poszczególnych wariantów sekwencji mtDNA jak dotąd przeprowadzano w sposób

pośredni, stosując chromatografię cieczową w środowiku denaturującym, rozdział elektroforetyczny w środowisku denaturującym oraz szereg innych metod. Niestety żadna z nich nie dorównuje szybkością i prostotą analizie HRM, a dodatkowo ich zastosowanie stwarza realne zagrożenie kontaminacji badanej próby [20, 21]. Dlatego też analiza HRM może z powodzeniem zostać zastosowana w celu identyfikacji chorób związanych z mutacjami w mtDNA, takich jak zespół MELAS (miopatia mitochondrialna, encefalopatia, kwasica mleczanowa, występowanie incydentów podobnych do udarów), zespół MERRF (ang. *Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers* – padaczka miokloniczna z czerwonymi, poszarpanymi włóknami), zespół NARP (ang. *Neurogenic myopathy, Ataxia, Retinitis Pigmentosa* – Neurogenna miopatia z ataksją i zwyrodnieniem barwnikowym siatkówki), LHON (ang. *Leber's hereditary optic neuropathy* – dziedziczna neuropatia nerwu wzrokowego Lebera), KSS (ang. *Kearns-Sayre syndrome* – Zespół Kearnsa-Sayre'a) [22, 23].

5.3. Analiza polimorfizmów SNP

W przypadku genotypowania polimorfizmów jednonukleotydowych rekomendowana długość badanego amplikonu jest znacznie mniejsza niż w przypadku wykrywania mutacji. O ile duże zmiany w sekwencji DNA mogą zostać wykryte poprzez analizę amplikonów o wielkości powyżej 300pz, to w przypadku małych delecji czy insercji wielkość ta powinna być znacznie krótsza. Niewielka długość fragmentów do analizy SNP jest wymagana w celu wyeliminowania możliwości przypadkowego wykrycia polimorfizmów poza interesującym nas regionem. Z drugiej strony tak niewielkie fragmenty tworzą komplikacje podczas samej analizy krzywych topnień. Krótkie fragmenty generują niższy poziom fluorescencji, prawdopodobnie z powodu mniejszej inkorporacji barwnika do krótkiej sekwencji DNA. W celu zapewnienia odpowiedniego poziomu fluorescencji długość amplikonu powinna mieścić się w przedziale 80-100pz. W takim przypadku, odliczając wielkość starterów, analiza HRM realnie bada fragment długości 30pz [24-26].

W przypadku subtelnych zmian w sekwencji badanego amplikonu, takich jak zmiany adeniny na tyminę i vice versa, różnica temperatur topnienia jest tak niewielka, że trudno rozróżnić krzywe na wykresie. Jest to związane z tym, iż w badanej cząsteczce taka zmiana nie powoduje zmiany ogólnej liczby wiązań wodorowych, więc jej stabilność nie ulega widocznej zmianie. W przypadku analizy takich sytuacji przed procedurą PCR dodaje się dziki DNA, który w wypadku istnienia mutacji powoduje powstanie hetero dupleksu. Heterodupleks jako zbudowany z jednej nici DNA dzikiego i z jednej nici fragmentu zawierającego polimorfizm posiada niesparowane zasady. Stabilność takiej cząsteczki jest dużo mniejsza, co

wpływa na zmianę temperatury topnienia a zarazem kształtu krzywej, co pozwala na łatwą identyfikację zmiany w analizowanej sekwencji [25-28].

Tabela 3. Klasyfikacja polimorfizmów SNP oraz częstość ich występowania [24-28]

| Klasa SNP | Zmiana zasady azotowej | Zmiana w Tm | Częstość występowania |
|-----------|------------------------|---------------|-----------------------|
| 1 | C/T & G/A | >0,5°C | 64% |
| 2 | C/A & G/T | >0,5°C | 20% |
| 3 | C/G | 0,2°C – 0,5°C | 9% |
| 4 | A/T | <0,2°C | 7% |

5.4. Zastosowanie w epigenetyce

HRMA w sposób pośredni umożliwia badanie poziomu ekspresji genów np. u chorych z nowotworami [29]. Zmiany w poziomie ekspresji genów takich jak geny supresorowe, regulujące apoptozę, naprawę DNA, czy mających wpływ na chemioterapię mogą doprowadzić do transformacji nowotworowej [30]. Zastosowanie konkretnych działań w celu polepszenia stanu chorych, jak i sama odpowiedź organizmu pacjenta na leczenie, są zależne od poziomu ekspresji konkretnych genów, który zależy ściśle od ich metylacji. Analiza HRM pozwala na wykrywanie wyłącznie zmian w sekwencji badanego fragmentu DNA. Dlatego też fragment ten traktuje się wodosiarczanem, co prowadzi do konwersji niemetylowanych cytozyn do uracylu. Zmianie ulega zatem ilość wiązań wodorowych i stabilność DNA, a co za tym idzie temperatura topnienia i kształt krzywej w HRMA. Określenie poziomu metylacji odbywa się poprzez porównanie krzywej topnienia dzikiego DNA z krzywymi generowanymi dla prób stworzonych przez mieszanie różnych proporcji metylovanego i niemetylowanego DNA [31]. Analiza poziomu metylacji może również posłużyć w celu diagnozowania zaburzeń imprintingu genomowego w jednostkach chorobowych takich jak syndrom Angelmana czy Pradera-Williego [32].

6. Podsumowanie

HRMA stanowi tańszą alternatywę dla genotypowania polimorfizmów typu SNP z wykorzystaniem sond TaqMan, jak i sekwencjonowania. Jednocześnie pozostaje techniką wysoce czułą i specyficzną. Jest metodą szybką i niedestrukcyjną dla DNA, dzięki czemu pozwala na jego ewentualne późniejsze analizy z wykorzystaniem innych metod. Cechuje się prostotą, możliwością wykonania analizy bezpośrednio po PCR bez jakiegokolwiek obróbki DNA. Sama analiza wyników nie jest skomplikowana i sprowadza się do porównania krzywych na wykresach. Umożliwia także pośrednią analizę ekspresji genów poprzez badania porównawcze poziomu ich metylacji. HRMA staje się metodą z wyboru do prowadzenia badań nad DNA jak również screeningu pacjentów pod względem patogennych wariantów DNA.

Literatura

1. Lyon E., Wittwer C.T. *LightCycler technology in molecular diagnostics*, The Journal of Molecular Diagnostics., 11 (2009), s. 93-101
2. Vossen R.H., Aten E., Roos A., den Dunnen J.T. *High-resolution melting analysis (HRMA): more than just sequence variant screening*, Human Mutation., 30 (2009), s. 860-866
3. Reed G.H., Kent J.O., Wittwer C.T. *High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics*, Pharmacogenomics., 8 (2007), s. 597-608
4. Cho M.H., Ciulla D., Klanderman B.J., Raby B.A., Silverman E.K. *High-resolution melting curve analysis of genomic and whole-genome amplified DNA*, Clinical Chemistry., 54 (2008), s. 2055-2058
5. Ririe K.M., Rasmussen R.P., Wittwer C.T. *Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction*, Analytical Biochemistry., 245 (1997), s. 154-160
6. Zhou L., Myers A.N., Vandersteen J.G., Wang L., Wittwer C.T. *Closed-tube genotyping with unlabeled oligonucleotide probes and a saturating DNA dye*, Clinical Chemistry., 50 (2004), s. 1328-1335
7. Mao F., Leung W.Y., Xin X. *Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications*, BMC Biotechnology., 7 (2007), s. 76
8. Monis P.T., Giglio S., Saint C.P. *Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis*, Analytical Biochemistry., 340 (2005), s. 24-34
9. Erali M., Wittwer C.T. *High resolution melting analysis for gene scanning*, Methods., 50 (2010), s. 250-261
10. Carpi F.M., Di Pietro F., Vincenzetti S., Mignini F., Napolioni V. *Human DNA extraction methods: patents and applications*, Recent Patents on DNA and Gene Sequences., 5 (2011), s. 1-7
11. Tan S.C., Yiap B.C. *DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present*, Journal of Biomedicine and Biotechnology., 2009
12. Zhang M.Q. *Statistical features of human exons and their flanking regions*, Human Molecular Genetics., 7 (1998), s. 919-932
13. Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K., Sekiya T. *Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America., 86 (1989), s. 2766-2770
14. Lerman L.S., Silverstein K. *Computational simulation of DNA melting and its application to denaturing gradient gel electrophoresis*, Methods in Enzymology., 155 (1987), s. 482-501
15. Tindall E.A., Petersen D.C., Woodbridge P., Schipany K., Hayes V.M. *Assessing high-resolution melt curve analysis for accurate detection of gene variants in complex DNA fragments*, Humn Mutation., 30 (2009), s. 876-883
16. Graham R., Liew M., Meadows C., Lyon E., Wittwer C.T. *Distinguishing different DNA heterozygotes by high-resolution melting*, Clinical Chemistry., 51 (2005), s. 1295-1298

17. Gundry C.N., Dobrowolski S.F., Martin Y.R., Robbins T.C., Nay L.M., Boyd N., Coyne T, Wall MD, Wittwer CT, Teng DH. *Base-pair neutral homozygotes can be discriminated by calibrated high-resolution melting of small amplicons*, Nucleic Acids Research., 36 (2008), s. 3401-3408
18. Ebili H.O., Ilyas M. *Cancer mutation screening: Comparison of high-resolution melt analysis between two platforms*, Cancer medical science., 9 (2015), s. 522
19. Andreu A.L., DiMauro S. *Current classification of mitochondrial disorders.*, Journal of Neurology., 250 (2003), s. 1403-1406
20. van Den Bosch B.J., de Coo R.F., Scholte H.R., Nijland J.G., van Den Bogaard R., de Visser M., de Die-Smulders C.E., Smeets H.J. *Mutation analysis of the entire mitochondrial genome using denaturing high performance liquid chromatography*, Nucleic Acids Research., 28 (2000), s. 89
21. Wong L.J., Chen T.J., Tan D.J. *Detection of mitochondrial DNA mutations using temporal temperature gradient gel electrophoresis*, Electrophoresis., 25 (2004), s. 2602-2610
22. Moraes C.T., DiMauro S., Zeviani M., Lombes A., Shanske S., Miranda A.F., Nakase H., Bonilla E., Werneck L.C., Servidei S., et al. *Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome*, New England Journal of Medicine., 320 (1989), s. 1293-1299
23. Sternberg D., Danan C., Lombès A., Laforêt P., Girodon E., Goossens M., Amselem S. *Exhaustive scanning approach to screen all the mitochondrial tRNA genes for mutations and its application to the investigation of 35 independent patients with mitochondrial disorders*, Human Molecular Genetics., 7 (1998), s. 33-42
24. von Ahsen N., Oellerich M., Schütz E. *Limitations of genotyping based on amplicon melting temperature*, Clinical Chemistry., 47 (2001), s. 1331-1332
25. Reed G.H., Wittwer C.T. *Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis*, Clinical Chemistry., 50 (2004), s. 1748-1754
26. Liew M., Pryor R., Palais R., Meadows C., Erali M., Lyon E., Wittwer C. *Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons*. Clinical Chemistry., 50 (2004), s. 1156-1164
27. Garritano S., Gemignani F., Voegelé C., Nguyen-Dumont T., Le Calvez-Kelm F., De Silva D., Lesueur F., Landi S., Tavtigian S.V. *Determining the effectiveness of High Resolution Melting analysis for SNP genotyping and mutation scanning at the TP53 locus*, BMC Genetics., 10 (2009), s. 5
28. Erali M., Palais R., Wittwer C. *SNP genotyping by unlabeled probe melting analysis*, Methods in Molecular Biology., 429 (2008), s. 199-206
29. Baylin S.B., Herman J.G. *DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics*, Trends in Genetics., 16 (2000), s. 168-174
30. Rodríguez López C.M., Guzmán Asenjo B., Lloyd A.J., Wilkinson M.J. *Direct detection and quantification of methylation in nucleic acid sequences using high-resolution melting analysis*, Analytical Chemistry., 82 (2010), s. 9100-9108
31. Athamanolap P., Shin D.J., Wang T.H. *Droplet Array Platform for High-Resolution Melt Analysis of DNA Methylation Density*, Journal of laboratory automation., 19 (2013), s. 304-312

32. Procter M., Chou L.S., Tang W., Jama M., Mao R. *Molecular diagnosis of Prader-Willi and Angelman syndromes by methylation-specific melting analysis and methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification*, *Clinical Chemistry*, 52 (2006), s. 1276-1283

Metoda High Resolution Melting Analysis i jej potencjalne zastosowania w biomedycynie

Streszczenie

High Resolution Melting Analysis (HRMA, analiza krzywych topnienia w wysokiej rozdzielczości) jest jednorodną, wysoce wydajną metodą analizowania kwasów nukleinowych. Analiza HRM zaczyna się bezpośrednio po reakcji amplifikacji badanego fragmentu DNA w procesie PCR i polega na stopniowym ogrzewaniu ampliconu w obecności interkalującego barwnika, który wykazuje wysoki stopień fluorescencji w przypadku występowania dwuniciowych cząsteczek DNA. Osiągnięcie temperatury topnienia dsDNA powoduje denaturację cząsteczki kwasu nukleinowego. Zastosowanie nowoczesnego sprzętu i specjalnie zaprojektowanych barwników, których fluorescencja spada wraz ze zmniejszającą się liczbą dwuniciowych cząsteczek umożliwia analizę krzywych topnienia. Wykrywanie niewielkich różnic w amplifikowanej sekwencji jest możliwe, gdyż każdy z ewentualnych wariantów sekwencji posiada nieznacznie odmienną temperaturę denaturacji. Nawet pojedyncza zmiana w bazowej sekwencji DNA próbki powoduje różnicę w krzywej topnienia. Dzięki wspomnianej technice możliwe staje się proste i szybkie wykrywanie polimorfizmów SNP, mapowanie DNA, wykrywanie mutacji, analiza metylacji DNA oraz wiele innych. Dodatkowo HRMA jest łatwa w obsłudze, prosta, elastyczna, tania, doskonale czuła i swoista, a na dodatek nie niszczy DNA, który po analizie można dalej wykorzystać. HRMA obecnie staje się narzędziem do screeningu pacjentów pod względem występowania wariantów patogennych, jak również może stanowić alternatywę dla typowego rozdziału elektroforetycznego kwasów nukleinowych.

Słowa kluczowe: HRMA, topnienie, DNA, SNP, mutacja

High Resolution Melting Analysis and its potential application in medicine

Abstract

High Resolution Melting Analysis (HRMA) is a homogeneous and highly efficient method to analyze nucleic acids. HRMA begins directly after the amplification of the region of interest. HRMA consist of heating of the amplicon in the presence of intercalating dye, which generate high fluorescence in the presence of double-stranded DNA molecules. dsDNA molecules denaturate after reaching the melting temperature. Melting curve analysis is possible using new equipment and specially designed dye whose fluorescence decreases with decreasing the number of double-stranded molecules. Detection small differences in the amplified sequence is possible because each of the possible sequence variants has a slightly different denaturation temperature. Even a single base change in the sequence of DNA results difference in the melting curve. HRMA enable a simple and quick detection of SNPs, DNA mapping, detection of mutations, DNA methylation analysis, and many others. Additionally HRMA is easy to use, simple, flexible, cheap, perfectly sensitive and specific, and in addition does not damage DNA, which after analysis can be further used. HRMA becomes a tool for screening patients for the presence of pathogenic variants and may also provide an alternative to the typical electrophoretic separation of nucleic acids.

Keywords: HRMA, melting, DNA, SNP, mutation

Mykoryza w biodegradacji

1. Wstęp

Biologiczny rozkład trwałych zanieczyszczeń organicznych (TZO), w tym substancji ropopochodnych oraz wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA), przez mikroorganizmy jest jednym z najważniejszych i najefektywniejszych sposobów usuwania tych związków ze środowiska glebowego [1]. Bioremediacja to technologia usuwania zanieczyszczeń, wykorzystująca żywe mikroorganizmy w celu katalizowania destrukcji lub transformacji różnego rodzaju zanieczyszczeń w formy mniej szkodliwe [1, 2]. Mikroorganizmy charakteryzują się wyjątkową w porównaniu z innymi organizmami zdolnością adaptacji do nowych warunków środowiska, prowadząc do przyspieszenia procesów, które już naturalnie zachodzą w glebie [3]. Produkty ropopochodne w wyniku aktywności metabolicznej drobnoustrojów ulegają całkowitemu lub częściowemu przekształceniu w masę bakteryjną i stabilne, nietoksyczne produkty końcowe. W warunkach tlenowych są nimi: CO₂ i H₂O, zaś w beztlenowych CH₄ [4], przy czym tlenowa degradacja zanieczyszczeń organicznych w glebie jest procesem bardziej efektywnym.

2. Biologiczny rozkład substancji ropopochodnych

Biologiczny rozkład substancji ropopochodnych może zachodzić na drodze: bioremediacji podstawowej, czyli naturalnie zachodzących procesów w miejscu skażenia, biostymulacji, czyli stymulacji mikroorganizmów autochtonicznych w celu przyspieszenia procesu biodegradacji oraz bioaugmentacji, czyli dzięki wprowadzeniu w miejsce skażenia odpowiednio wyselekcjonowanych mikroorganizmów glebowych, w tym grzybów mykoryzowych [2, 4].

Wzbogacenie zanieczyszczonej gleby w mikroorganizmy o dużej zdolności do biodegradacji zanieczyszczeń, stosuje się w przypadku, gdy

¹ Zakład Mikrobiologii Rolniczej, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy, ul. Czartoryskich 8; 24-100 Puławy, tel. 81 47 86 950, e-mail: agalazka@iung.pulawy.pl

² Zakład Gleboznawstwa Erozji i Ochrony Gruntów, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy, ul. Czartoryskich 8; 24-100 Puławy, tel. 81 47 86 950, e-mail:rgalazka@iung.pulawy.pl

rodzima populacja drobnoustrojów nie wykazuje pożądanej aktywności w kierunku biodegradacji zanieczyszczeń [3, 5]. Pod uwagę branych jest szereg czynników abiotycznych i biotycznych związanych z charakterystyką mikroorganizmów oraz z rozkładem WWA w glebie.

Stabilność struktury gleby istotnie wpływa na charakter i zawartość materii organicznej w glebie. Użytkowanie gruntów i stosowanie szeregu zabiegów remediacyjnych ma wpływ na ilość i jakość materii organicznej gleby a tym samym na jej agregację. Grzyby mykoryzowe są jednym z najważniejszych czynników biotycznych warunkujących jakość środowiska glebowego. Odgrywają bardzo ważną rolę w agroekosystemie, a poprzez produkcję glomalin mogą stanowić istotny czynnik pozytywnego oddziaływania na wzrost i zdrowotność roślin, a także w zabiegach poprawiających strukturę gleby, przy stabilizacji gruntów na obszarach podatnych na erozję i gruntów poddawanych rekultywacji [2, 6, 7]. Można spodziewać się, że w przyszłości dokładniej poznana budowa i funkcje glomalin przyczynią się do uzyskania znacznych efektów poprawy wzrostu i produktywności roślin również na terenach zanieczyszczonych. Skuteczność kompleksowego podejścia do problemów wzajemnych oddziaływań pomiędzy roślinami i drobnoustrojami glebowymi potwierdzają uzyskiwane wyniki badań, gdzie uwzględniono nie tylko dobór roślin do określonych warunków glebowych, ale również wykorzystywanie wspomagających ich wzrost mikroorganizmów glebowych. W wielu ośrodkach badawczych prowadzone są intensywne badania nad możliwością wykorzystania drobnoustrojów glebowych, w tym także grzybów AMF w bioremediacji. Produkcja glomalin i jej rola w stabilizacji struktury gleby staje się więc dla środowiska glebowego alternatywną metodą wspierającą biologiczne procesy bioremediacji gleb skażonych wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi i metalami ciężkimi [3, 4, 8].

3. Arbuskularne grzyby mykoryzowe (AMF)

Powszechnie występującymi grzybami glebowymi, o kluczowym znaczeniu dla roślin, są arbuskularne grzyby mykoryzowe (AMF) [9]. Mykoryzaarbuskularna została odkryta przez polskiego mykologa, Franciszka Kamińskiego, u *Monotropahypopitys* L. [9]. Symbioza grzybów AMF z roślinami jest prawdopodobnie najstarszą i najczęściej występującą symbiozą pomiędzy grzybem a rośliną [3, 7]. Zewnętrzne struktury grzybów AMF to penetrujące glebę strzępki i pojedyncze spory spoczynkowe. Symbiozę tę nazywa się symbiozą arbuskularną, ponieważ jedyną strukturą obecną w komórkach miększu roślin są arbuskule, tj. rozgałęzione końce strzępek, które biorą udział w dwustronnej wymianie węgla, fosforu i innych fizjologicznie znaczących cząstek [9]. Grzyby te są

zdolne do tworzenia obligatoryjnej symbiozy z co najmniej 80% wszystkich roślin na kuli ziemskiej [9]. Symbioza ta jest tworzona z wieloma trawami, niemal ze wszystkimi roślinami użytkowanymi rolniczo, w tym także z roślinami bobowatymi oraz niektórymi drzewami i krzewami [2]. Występuje ona w glebach o pH bliskim neutralnego, zawierających przyswajalny azot mineralny. Fosfor jest często składnikiem występującym w tych warunkach w ograniczonej ilości [3]. Bliski kontakt strzępek z komórkami rośliny umożliwia nawiązanie symbiozy odżywczej pomiędzy rośliną a grzybem, gdzie grzyby zyskują środowisko wzrostu i korzystają z węglowodanów rośliny, natomiast roślina ma zwiększone możliwości pobierania wody i składników mineralnych z gleby za pośrednictwem rozbudowanej sieci strzępek pozakorzeniowych [4]. Wymiana składników pokarmowych zachodzi pomiędzy rozgałęzionymi strzępkami grzybni a membraną komórkową rośliny [9]. Kolonizacja wnętrza korzeni przez strzępki grzybów endomykoryzowych powoduje zmiany zarówno morfologiczne jak i fizjologiczne u obu symbiontów, w tym zmianę składu i ilości wydzielin korzeniowych [9].

Efektom współdziałania grzybów AMF i roślin jest szereg obustronnych korzyści partnerów symbiotycznych. Pobieranie z gleby składników pokarmowych i ich translokacja głównie fosforu, to jedna z podstawowych funkcji grzybów AMF. Konwersja węgla roślinnego do związków glikolipidowych stanowi mechanizm akumulacji substancji pokarmowych przez grzyby [1]. Grzyby korzystają z łatwo dostępnego węgla asymilowanego przez rośliny, co pozytywnie wpływa na wzrost i produktywność większości roślin naczyniowych. Stymulacja wzrostu roślin wynika nie tylko ze zwiększonej ilości zasymilowanego węgla, ale również ze zwiększonej ilości pobranego fosforu, i w mniejszym stopniu azotu [9]. W literaturze możemy również znaleźć szeroko opisane korzystne oddziaływanie grzybów mykoryzowych na sukcesje roślin, ich konkurencyjność oraz fenologie [1, 2]. Współdziałanie grzybów mikoryzy arbuskularnej i roślin przejawia się również w aspekcie środowiskowym poprzez podtrzymywanie różnorodności gatunkowej roślin wskutek wyrównywania poziomu ich odżywienia przez przemieszczanie składników pokarmowych z roślin lepiej odżywionych do roślin o słabszej kondycji za pośrednictwem symbiozy z grzybami mykoryzowymi [9]. Znany jest także pozytywny wpływ grzybów AMF na procesy bioremediacji gleb skażonych substancjami ropopochodnymi i metalami ciężkimi [8]. Sądzi się, że rośliny mykoryzowe są bardziej odporne na suszę, ponadto roślina jest chroniona przed patogenami, nicieniami i dużym stężeniem metali ciężkich w strefie korzeni. Grzyby arbuskularne istotnie zwiększają tolerancję roślin na metale ciężkie [9], zasolenie gleby [1] i uodparniały rośliny na stresy wodne [2] oraz patogeniczne grzyby i nicienie [6].

Grzyby AMF odpowiedzialne za produkcję glomalin należą do rzędu *Glomerales* skupiającego rodzinę *Glomeraceae* z rodzajem *Glomus* [9]. W rodzaju *Glomus* wyodrębniono natomiast dwie grupy, *Glomus* – A i *Glomus* – B. W naturalnym środowisku stwierdza się dużą, różnorodność grzybów AMF. Do najczęściej spotykanych grzybów AMF zaliczamy: *Glomus mosseae* (zakażający m.in. bób, bobik *Vicia faba*) i *Glomus fasciculatum* (zakażający soję *Glycine max*). Zdolność produkcji i magazynowania glomalin w strzępkach grzybowych jest charakterystyczna wyłącznie dla arbuskularnych grzybów mykoryzowych.

4. Mykoryzoremediacja

Mykoryzoremediacja jest technologią bazującą na wykorzystaniu grzybów mykoryzowych do zwiększenia tolerancji roślin na pierwiastki śladowe, a tym samym poprawiającą efektywność detoksykacji środowiska z tych substancji. Grzyby mykoryzowe posiadają zwiększoną tolerancją na stres środowiskowy (również związany z dostępem zanieczyszczeń np. metalami ciężkimi i substancjami ropopochodnymi). Symbioza grzybów mykoryzowych z rośliną poprawia zapotrzebowanie rośliny na składniki mineralne a jednocześnie kumuluje istotną część zanieczyszczeń w komórkach korzeniowych oraz w strefie ryzosfery. Taka kumulacja zanieczyszczeń w komórkach roślinnych zmniejsza transport zanieczyszczeń w wyższe partie rośliny i zapobiega ich rozprzestrzenianiu się w glebie [8].

Mykoryza okazała się szczególnie przydatna w procesach fitostabilizacji. Pomimo iż pierwsze rośliny, kolonizujące tereny o podwyższonej zawartości substancji ropopochodnych i pierwiastków śladowych, to zazwyczaj gatunki niemykoryzowe, wykształcenie zwartej pokrywy roślinnej, jak również poprawa struktury gleby uzależnione są od pojawienia się symbiotycznych grzybów. Jest to szczególnie ważne w obrębie takich siedlisk, jak tereny zanieczyszczone materiałem poflotacyjnym i na terenach rafinerii. Deponowany w osadnikach materiał jest ubogi w związki azotu i fosforu, charakteryzuje go niska zdolność zatrzymywania wody i jest szczególnie podatny na erozję wietrzną [9]. Samoistna kolonizacja takiego podłoża przez grzyby arbuskularne jest procesem długotrwałym. Grzybnia niektórych szczepów, takich gatunków jak *Glomus mosseae*, tolerujących obecność podwyższonych stężeń metali, zdolna jest do wiązania kilkakrotnie większych ilości metali (ok. 65-75%) niż grzybnia gatunku stosowanego często w bioremediacji — *Rhizopusar rhizus* (35-45%) [10]. Zdolność do wiązania i detoksykacji metali w częściach podziemnych rośliny, uzyskana dzięki mykoryzie, okazała się szczególnie przydatna dla stymulacji wzrostu roślin uprawnych hodowanych na podłożach zanieczyszczonych. Rośliny te były szczepione

grzybnią wyizolowaną z metalofitu *Viola calaminaria*. Stwierdzono, iż szczepy izolowane z terenów zanieczyszczonych są znacznie bardziej przydatne niż szczepy pochodzące z miejsc niezanieczyszczonych. Szczep pochodzący z *Viola calaminaria* wykazał najwyższą wśród badanych szczepów efektywność wiązania metali (73%) [11]. Badania i selekcja szczepów najbardziej efektywnych w bioremediacji muszą wiązać się z efektywnością tych szczepów w konkurencji z innymi grzybami, które mogą pojawić się na danym terenie. W ostatnich latach, dzięki zastosowaniu metod molekularnych, pojawiła się możliwość śledzenia dalszych losów wprowadzonego szczepu, zarówno w warunkach kultur doniczkowych, jak i w materiale pobranym z terenu. Dla szeregu gatunków i szczepów istnieją specyficzne startery, pozwalające na stwierdzenie obecności wprowadzonych grzybów w obrębie próbek korzeni, odpowiednio wybarwionych, w celu uwidocznienia znajdującej się w ich wnętrzu grzybni. Wykorzystuje się w tym przypadku metodę zagnieżdżonej reakcji łańcuchowej polimerazy [12]. Poza analizą parametrów partnera grzybowego konieczne jest także przeprowadzanie dokładnych obserwacji mechanizmów pozwalających roślinie na tolerowanie skażenia przekazywanych jej przez grzybnię. Rośliny w różny sposób reagują na skażenie [13], a dodatkowo potrafią regulować stopień kolonizacji mykoryzowej. Grzyby ektomykoryzowe pojawiają się na terenach silnie zanieczyszczonych znacznie szybciej niż arbuskularne. Wynika to z faktu tworzenia przez nie drobnych zarodników w obrębie owocników eksponujących warstwę rodzajną przeważnie nad powierzchnią ziemi, dzięki czemu zarodniki te są łatwo rozprzestrzeniane przez wiatr, nawet na duże odległości. Poszczególne szczepy oraz gatunki grzybów ektomykoryzowych różnią się także pod względem efektywności w ochronie drzew na terenach skażonych [12]. Zjawisko to można szczególnie łatwo zaobserwować porównując w warunkach labo ratoryjnych szczepy izolowane z terenów zanieczyszczonych i niezanieczyszczonych [9, 14]. Za istotny mechanizm ochronny, pozwalający na przetrwanie drzew w warunkach zanieczyszczenia, uważa się unieruchamianie zanieczyszczenia w obrębie grzybni i zahamowanie ich transferu do tkanek roślinnych [14]. Zjawisko to tłumaczy się wiązaniem pierwiastków przez pigmenty deponowane na powierzchni grzybni przerastającej glebę [12], w obrębie ściany grzybni oraz w bogatych w fosfor ziarnistościach wakuolarnych. W większości przypadków efekt biofiltracji dotyczy grzybni ekstramatrykalnej. Wprowadzenie drzew na tereny hałd i wykształcenie właściwego systemu korzeniowego pozwala na poprawę struktury gleby oraz zwiększenie ilości materii organicznej, co z kolei stwarza lepsze warunki dla rozwoju roślin zielnych wraz z towarzyszącymi im organizmami symbiotycznymi [11].

Grzyby mykoryzowe gromadzą ponadto znaczne ilości zanieczyszczeń (w tym pierwiastków śladowych) w obrębie swoich komórek, wykorzystując podobne mechanizmy ich immobilizacji i detoksykacji jak komórki roślinne. Pierwiastki śladowe akumulowane są m.in. w ścianie komórkowej, gdzie są wiązane głównie przez chitynę, sekwestrowane w wakuoli i innych organellach systemu błon wewnętrznych oraz wiązane na terenie cytozolu przez bogate w cysteinę białka, metalotioneiny. Tak więc, obecność grzybów mykoryzowych będących w symbiozie z roślinami powoduje unieruchomienie stosunkowo dużych ilości zanieczyszczeń zarówno w obrębie ryzosfery, jak i w strzępkach grzybowych [15].

Pomimo, iż liczebność grzybów endomykoryzowych maleje przy rosnącym stężeniu ksenobiotyków, mogą one jednak wspomagać wzrost roślin przez obniżenie stresu związanego z brakiem dostępności fosforu oraz wody, jak również wzmacniać produkcję enzymów oksydacyjnych. Grzyby ektomykoryzowe mogą dodatkowo produkować enzymy uczestniczące co najmniej w etapach wstępnych lub pośrednich rozkładu ksenobiotyków, co pozwala na ułatwienie dalszego rozkładu przez inne organizmy ryzosfery (kometabolizm w degradacji substancji ropowchodnych) [15, 17]. Rola mykoryzy niekoniecznie musi polegać na wzmożeniu procesu fitoekstrakcji, ale przede wszystkim na zwiększeniu biomasy plonu, poprawie warunków glebowych oraz na ochronie roślin przed patogenami.

5. Udział glomaliny produkowanych przez grzyby mykoryzowe w detoksykacji środowiska glebowego

Intensywny rozwój ekologii jako głównego nurtu ochrony środowiska skłania naukowców do poszukiwania nowych, alternatywnych rozwiązań będących podstawą zrównoważonego rozwoju środowiska i dbałości o naturalne procesy zachodzące w glebie. Stąd też, alternatywą stosowania sztucznego nawożenia w procesach bioremediacji jest zastosowanie szczepionki zawierającej bakterie wspomagające mykoryzę oraz grzyby z rodzaju *Glomus* produkujące glikoproteiny glebowe stabilizujące strukturę gleby – glomaliny, które są termostabilne, nierozpuszczalne w wodzie i gromadzą się w glebie. Strzępki grzybów mykoryzowych mają zdolność do hiperakumulacji wielu pierwiastków śladowych tj.: Cd czy Pb, zmniejszając w ten sposób ich pobieranie przez rośliny [11, 12]. Niewątpliwie w proces ten zaangażowane są grzyby z rodzaju *Glomus* produkujące glomaliny [54]. Są to białka o bardzo unikalnych właściwościach fizyko-chemicznych, pełniące fundamentalną rolę w tworzeniu struktury gleby [18, 19]. Glomaliny sklejają agregaty glebowe i tym samym stabilizują strukturę gleby [19]. Zawartość glomaliny

w gruzełkach glebowych jest istotnie skorelowana z ich trwałością (wodoodpornością). Istnieje hipoteza, że grzyby mykoryzowewytwarzają duże ilości glomalin, aby poprawić środowisko wzrostu dla swoich gospodarzy. Możliwe jest, że glomaliny mają udział w tworzeniu właściwości hydrofobowych cząstek glebowych pozwalających na przenikanie powietrza i przepływ wody. Takie właściwości glomalin jak nierozpuszczalność, kleistość i hydrofobowość mogą inicjować i chronić powstające agregaty glebowe przed degradacją. Badania wykazują, iż glomaliny powszechnie występuje w glebie i stanowią magazyn węgla, którego źródłem jest atmosferyczny CO₂. Białka te zaliczane są do glebowej materii organicznej. Glomaliny występują powszechnie w glebie, także w glebach uprawnych Polski [20].

Włączenie w proces bioremediacji grzybów mykoryzowych produkujących glomaliny powinno poprawić agregację gleby i pobieranie z gleby składników pokarmowych i ich translokację, głównie fosforu. W trakcie procesu po pewnym czasie biomasa grzybni ulega degradacji – ale nie glomaliny. Większość jej, na ogół w niezmienionej formie, pozostaje w glebie nawet kilkadziesiąt lat [9, 20].

Grzyby mykoryzowe poprzez produkcję glomalin znacznie zwiększają efektywność procesu mykoryzoremediacji. Przede wszystkim zmniejszają rozprzestrzenianie się metali na inne tereny oraz ich penetrację w głąb profilu glebowego oraz ich przedostawanie się do wód gruntowych. Wykazano, że z roślin laboratoryjnie inokulowanych grzybami mikoryzowymi z grama glomalin można wyekstrahować 0,08 mg Cd, 4,3 mg Cu oraz 1,12 mg Pb. Eksperyment przeprowadzony *in vitro* wykazał, że *Gigasporarosea* sekwestruje 28 mg Cu na gram glomalin, co stanowiło 35% ogółu Cu dodanej do podłoża [21].

6. Podsumowanie

Grzyby mykoryzowe są także przydatne do określenia toksyczności podłoża lub wydajności procesu bioremediacji i mogą zastąpić chemiczne metody oceny toksyczności podłoża, szczególnie gdy czynników stresowych jest więcej. Tego typu badania przeprowadza się na glebie pobranej z terenu i analizuje się parametry mykoryzacji na materiale hodowanym na tej glebie w warunkach laboratoryjnych. W takim monitoringu ważny jest staranny dobór zarówno szczepu grzyba, jak i odpowiedniej rośliny. Wśród dotychczas przebadanych gatunków roślin na uwagę zasługuje zazwyczaj silnie kolonizowana przez grzyby arbuskularne babka lancetowata (*Plantagolanceolata* L.), która występuje na zróżnicowanych siedliskach, jest odporna na szeroki zakres elementów stresowych, a także możliwe jest w stosunkowo prosty sposób uzyskanie

klonów jednej rośliny, co pozwala na eliminację genetycznych różnic między osobnikami pod względem reakcji na substancje toksyczne. Europa Środkowa i Wschodnia to teren o szczególnie częstym występowaniu rozległych hałd przemysłowych, terenów depozycji odpadów różnego typu oraz miejsc, gdzie w niewystarczającym stopniu zabezpieczano niewykorzystane środki ochrony roślin, jak również obszary znajdujące się pod wpływem intensywnej motoryzacji i uprzemysłowienia. Pomimo często prawidłowo prowadzonej akcji uświadamiającej mieszkańcom problem skażenia, wciąż napotykamy uprawy roślin przeznaczone do konsumpcji na terenach silnie zanieczyszczonych. Potrzebne są tu tanie i szybkie metody monitoringu, a następnie niedrogie i skuteczne techniki fitoremediacji, w których zastosowanie grzybów mykoryzowych powinno odgrywać istotną rolę. Powyższe rozważania obrazują, jak szerokie i różnorodne są możliwości wykorzystania procesów biologicznych w utylizacji zanieczyszczeń gleb substancjami ropopochodnymi i metalami ciężkimi.

Uwagi

Opracowanie wykonano w ramach realizacji zadanie 1.4. Ocena i kształtowanie bioróżnorodności środowiska glebowego oraz aktywności mikrobiologicznej gleb z uwzględnieniem różnych warunków siedliskowych i systemów gospodarowania. Program Wieloletni IUNG-PIB nalata (2016-2020).

Literatura

1. Andreoni V., Gianfreda L. *Bioremediation and monitoring of aromatic-polluted habitats*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 76 (2007), s. 287-308
2. Atlas R.M. *Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspectives*. Microbiol. Rev., 45 (1981), s. 180-209
3. Gałązka A. *Przegląd biologicznych metod oczyszczania gleb skażonych wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi*. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych, 535 (2009), s. 103-110
4. Gałązka A. *Zanieczyszczenia gleb substancjami ropopochodnymi z uwzględnieniem biologicznych metod ich oczyszczenia*. KOSMOS Problemy Nauk Biologicznych Tom 64, 1 (306) (2015), 145-164
5. Chauhan A., Fazlurrahman, Oakeshott J.G., Jain R.K. *Bacterial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: strategies for bioremediation*, Indian J. Microbiol., 48 (2008), s. 95-113
6. Johnsen A.R., Karlson U. *Diffuse PAH contamination of surface soils: environmental occurrence, bioavailability, and microbial degradation*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 76 (2007), s. 533-543

7. Li X., Li P., Lin X., Zhang Ch., Lia Q., Gong Z. *Biodegradation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by microbial consortia in soil and slurry phases*. Journal of Hazardous Materials, 150 (2008), s. 21-26
8. Gałązka A., Gałązka R. *Phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils artificially polluted using plant-associated-endophytic bacteria and Dactylis glomerata as the bioremediation plant*, Polish Journal of Microbiology, 64(3) (2015), s. 239-250
9. Gałązka A., Gawryjolek K. *Glomalina – glikoproteina produkowana przez grzyby mykoryzuarbuskularnej*, Postępy Mikrobiologii, 54(3) (2015), s. 331-343
10. Khan A.G. *Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation*, Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 18 (2005), s. 355-364
11. Joner E.J., Johannes A., Loibne A.P., De La Cruz M.A., Szolar O.H., Portal J.M., Leyval C. *Rhizosphere effects on microbial community structure and dissipation and toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in spiked soil*, Environmental Science and Technology, 35 (2007), s. 2773-2777
12. Khan A.G. *Mycorrhizoremediation – an enhanced form of phytoremediation*. Journal of Zhejiang University SCIENCE B, 7 (7) (2006), s. 503-514
13. Blaudez D., Jacob C., Turnau K., Colpaert J.V., Ahonen-Jonnarh U., Finlay R., Botton B., Chalot M. *Differential responses of ectomycorrhizal fungi to heavy metals in vitro*. Mycological Research, 104 (2000), s. 1366-1371
14. Tsimilli-Michael M., Eggenberg P., Biro B., Köves-Pechy K., Vörös I., Strasser R.J. *Synergistic and antagonistic effects of arbuscular mycorrhizal fungi and Azospirillum and Rhizobium nitrogen-fixers on the photosynthetic activity of alfalfa, probed by the polyphasic chlorophyll a fluorescence transient, O-J-I-Pq*. Applied Soil Ecology, 15 (2000), s. 169-182
15. Gonzalez-Chavez M.C., D'haen J., Vangronsveld J.J., Dodd J.C. *Copper sorption and accumulation by the extraradical mycelium of different Glomus spp. (arbuscular mycorrhizal fungi) isolated from the same polluted soil*. Plant and Soil, 240 (2) (2002), s. 287-297
16. Gonzalez-Chavez M.C., Carrillo-Gonzalez R., Wright S.F., Nichols K. *The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements*, Environmental Pollution, 130 (3) (2004), s. 317-323
17. Antosiewicz D.M. *Adaptation of plants to an environment polluted with heavy metals*, Acta Societatis Botanicorum Poloniae, 61 (1992), s. 281-299.
18. Driver J.D., Holben W.E., Rillig M.C. *Characterization of glomalin as a hyphal wall component of arbuscular mycorrhizal fungi*, Soil Biology and Biochemistry, 37 (2005), s. 101-106
19. Gałązka A. *Charakterystyka glomalina i oddziaływania różnych systemów uprawy na ich zawartość w glebie*, Polish Journal of Agronomy, 15 (2013), s. 75-82
20. Wright S.F., Upadhyaya A. *Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein from arbuscular mycorrhizal fungi*, Soil Science, 161 (1996), s. 575-586

21. Ciesielczuk T., Kusza G., Poluszyńska J., Kochanowska K. *Pollution of Flooded Arable Soils with Heavy Metals and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)*, Water Air and Soil Pollution, 225 (10) (2014), s. 21-45

Mykoryza w biodegradacji

Streszczenie

Grzyby mykoryzowe mają zdolność do hiperakumulacji wielu pierwiastków śladowych tj.: Cd czy Pb, i rozkładu zanieczyszczeń ropopochodnych zmniejszając w ten sposób ich pobieranie przez rośliny. Niewątpliwie w proces ten zaangażowane są grzyby z rodzaju *Glomus* produkujące glikoproteiny glebowe – glomaliny. Glomaliny są termostabilne, nierozpuszczalne w wodzie glikoproteiny i mające tendencję do akumulacji w glebie. Są to białka o bardzo unikalnych właściwościach fizyko-chemicznych, pełniące fundamentalną rolę w tworzeniu struktury gleby. Glomaliny sklejają agregaty glebowe i tym samym stabilizują strukturę gleby przez co pozytywnie wpływają na proces bioremediacji.

Słowa kluczowe: glomalina, grzyby mykoryzowe, biodegradation

Mycorrhiza in biodegradation

Abstract

Mycorrhizal fungi are capable to accumulation many trace elements, ie: Cd and Pb, and decomposition of organic pollutants thereby reducing their uptake by plants. Undoubtedly, in this process fungi of the genus *Glomus* are involved producing soil glycoproteins – glomalins. Glomalins are thermostable, water-insoluble and tend to accumulate in the soil. These are proteins with a very unique physicochemical properties performing a fundamental role in making soil structure. Glomalins glue soil aggregates and thus stabilize the soil structure which positively affects biodegradation.

Keywords: glomalins, mycorrhizal fungi, biodegradation

Roman Adamczyk¹, Mateusz Cholewiński², Joanna Wilk³, Wojciech Baran⁴,
Ewa Adamek⁵

Ocena ekotoksyczności produktów degradacji metodą Fentona antybiotyków weterynaryjnych

1. Wstęp

1.1. Wprowadzenie

Wraz z rozwojem cywilizacyjnym i wzrostem liczby ludności na świecie mamy do czynienia z coraz to nowymi i większymi zagrożeniami dla środowiska naturalnego. W hodowli zwierząt szczególnie istotna staje się wydajność produkcji. Producenci walczą z chorobami i starają się sprostać konkurencji. Środki przeciwbakteryjne są od kilkudziesięciu lat ważnym sprzymierzeńcem hodowców. Wiele z państw na świecie znacznie ograniczyło stosowanie antybiotyków jako promotorów wzrostu. Jednak wraz z wzrostem oporności wśród mikroorganizmów, hodowcy na przestrzeni ostatnich dziesięciu lat zostali zmuszeni wprowadzać nowe grupy leków przeciwbakteryjnych i często zwiększać również ich zużycie. Wraz z dużym wykorzystaniem antybiotyków w medycynie może to stanowić potencjalne zagrożenie dla środowiska naturalnego, szczególnie wodnego [1]. Badania w wielu krajach pokazują, że w wodach powierzchniowych można znaleźć bardzo wiele różnych antybiotyków. Dlatego coraz większe znaczenie ma efektywne usuwanie antybiotyków ze ścieków.

¹ adamczyk.romeek@gmail.com, Zakład Chemii Ogólnej i Nieorganicznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl

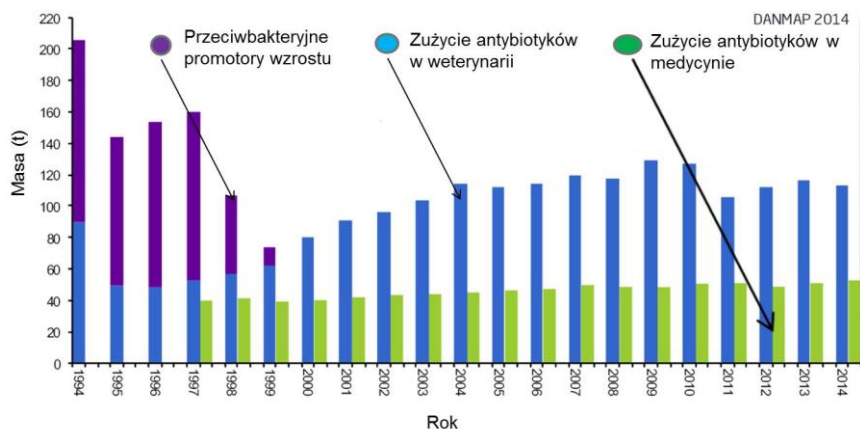
² mateochol@tlen.pl, Zakład Chemii Ogólnej i Nieorganicznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl

³ j.kliww@gmail.com, STN przy Zakładzie Chemii Ogólnej i Nieorganicznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl

⁴ bw-xxl@wp.pl, Zakład Chemii Ogólnej i Nieorganicznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl

⁵ eadamek@sum.edu.pl, Zakład Chemii Ogólnej i Nieorganicznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl

Ważne jest również to, aby metoda ta nie była toksyczna dla naturalnej mikroflory wody [2]. Na przykładzie Danii można zauważyć, że mimo zakazania stosowania antybiotyków jako promotorów wzrostu w hodowli, to zużycie antybiotyków tuż po wprowadzeniu tego zakazu rosło systematycznie. Jak widać zużycie antybiotyków w weterynarii stanowi ok. 2/3 całkowitego wykorzystania antybiotyków w Danii (Wykres 1) [3].



Wykres 1. Zużycie leków przeciwbakteryjnych w Danii w roku 2014 [3]

1.2. Leki przeciwbakteryjne

Wraz z rozwojem cywilizacyjnym i tworzeniem się dużych skupisk ludzkich, zaczęły się pojawiać coraz to nowe bakterie wywołujące choroby zakaźne. Na przestrzeni wieków różne epidemie pochłonęły wiele ludzkich istnień. Ponad sto lat temu nastąpił przełom w walce z bakteriami. Zaczęły pojawiać się pierwsze chemioterapeutyki, a w roku 1929 odkryto pierwszy naturalny antybiotyk. Dziś istnieje wiele leków działających skutecznie na różnego rodzaju bakterie, jednak cały czas powstają również nowe, bardzo odporne szczepy bakterii [4].

Pod względem mechanizmu działania antybiotyki można podzielić na:

- Hamujące syntezę ściany komórki bakteryjnej

Antybiotyki hamujące syntezę ściany komórkowej blokują aktywność enzymów odpowiedzialnych za syntezę mureiny. W grupie tej znajdują się antybiotyki β -laktamowe (penicyliny naturalne, penicyliny półsyntetyczne I generacji – posiadające wąskie spektrum działania, penicyliny półsyntetyczne II generacji np. ampicylina – posiadające szerokie spektrum działania, cefalosporyny I, II, III, IV generacji, monobaktamy, karbapenemy, inhibitory β -laktamaz), antybiotyki glikopeptydowe, glikolizo-

peptydowe i glikolipodepsypetydowe, antybiotyki peptydowe, fosfomycyna i cykloseryna.

- Antybiotyki uszkadzające błony cytoplazmatyczne bakterii

Niektóre antybiotyki zaburzające syntezę ściany komórkowej naruszają integralność błony cytoplazmatycznej podczas przedostawania się do komórki bakteryjnej. Jednak wyróżnia się antybiotyki działające ściśle na błonę cytoplazmatyczną. W grupie tej znajdują się: polimyksyny, antybiotyki peptydowe, antybiotyki polienowe i daptomycyna.

- Antybiotyki hamujące biosyntezę białek bakteryjnych

Antybiotyki te hamują biosyntezę białek bakteryjnych na różnych etapach. Mogą hamować syntezę białek już na samym początku, na poziomie rybosomalnym lub nawet bez wiązania się z podjednostkami 30S i 50S rybosomów. Zaliczamy tutaj: rifamycyny, aminoglikozydy, tetracykliny (Doksycyklina), chloramfenikol, makrolidy (Tylozyna), ketolidy, linkozamidy, streptograminy, fusydany, mupirocynę i retapamulinę.

- Syntetyczne leki przeciwbakteryjne

Mechanizm działania polega na hamowaniu biosyntezy białek poprzez blokowanie wytwarzania kwasów nukleinowych. W tej grupie można wyróżnić: sulfonamidy, chinolony, fluorochinolony, pochodne nitroimidazolu [5].

Do badań wybrano trzy antybiotyki, ich krótką charakterystykę przedstawiono w tabeli 1.

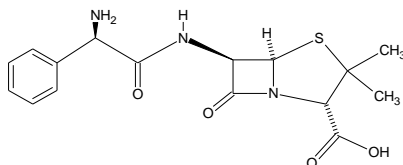
Tabela 1. Charakterystyka wybranych antybiotyków

| Nazwa | Grupa | Zastosowanie |
|--------------|--------------|------------------------|
| Ampicylina | Penicyliny | Medycyna i weterynaria |
| Doksycyklina | Tetracykliny | Medycyna i weterynaria |
| Tylozyna | Makrolidy | Weterynaria |

Źródło: [5]

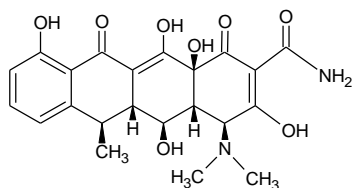
Ampicylina (rysunek 1) to antybiotyk β -laktamowy z grupy aminopenicylin. Ten lek o szerokim spektrum działania jest niestety wrażliwy na enzymy bakteryjne: β -laktamazy. Swoje działanie bakteriobójcze wywiera poprzez hamowanie syntezy ściany komórkowej mikroorganizmu. Pod względem chemicznym przy podaniu doustnym stosuje się kwas, natomiast przy podaniu pozajelitowym sól sodową. Ampicylina wykazuje aktywność przeciwbakteryjną m.in. wobec: *Actinomyces*, *Bacillus anthracis*, *Brucella*, *Campylobacter spp.*, *Clostridium spp.*, *Enterococcus* – z wyjątkiem *E. faecium*, *Escherichia coli* (40% szczepów opornych), *Fusobacterium*, *Streptococcus pneumoniae*, *H. influenzae* (do dziesięciu procent szczepów opornych w Polsce), *N.*

meningitidis, *N. gonorrhoeae*, *Listeria monocytogenes*, *Peptostreptococcus*, *Prevotella melaninogenica*, *P. mirabilis*, *Salmonella spp.*, *Shigella*, (występują szczepy odporne). Natomiast jest nieskuteczna wobec: *B. fragilis*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Proteus* indolododatni, *Providentia*, *Pseudomonas*, *Serratia*. Skojarzenie z inhibitorem β -laktamaz powoduje aktywność wobec niektórych szczepów opornych [5, 6].



Rysunek 1. Ampicylina [5]

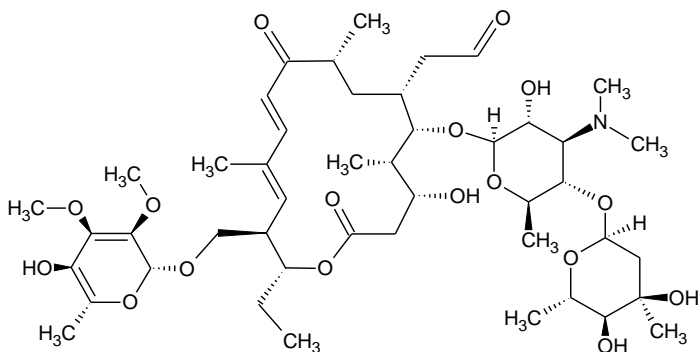
Doksycyklina (rysunek 2) to długo działający antybiotyk tetracyklinowy. Należy do grupy leków o działaniu bakteriostatycznym. Mechanizm działania jest taki sam jak w przypadku innych tetracyklin. Jest to hamowanie rybosomalnej biosyntezy białka, poprzez wiązanie się z podjednostką rybosomalną S30. W wyniku tego połączenie pomiędzy tRNA oraz kompleksem rybosom-mRNA zostaje uniemożliwione. Spektrum przeciwbakteryjne: *Actinomyces*, *Bacteroides fragilis*, *Borelia* (*B. burgdorferi*), *Brucella*, *Campylobacter*, *Chlamydia*, *Clostridium*, *Haemophilus*, *Legionella*, *Leptospira*, *Listeria*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycoplasma*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pasteurella tularensis*, *Propionibacterium*, *Rickettsia*, *Streptococcus pneumoniae*, *Treponema*, *Ureaplasma*, *Vibrio*, *Yersinia*. Brak aktywności wobec: *Proteus*, *Providencia*, *Serratia*, *Pseudomonas aeruginosa*. Zakres działania przeciwbakteryjnego jest niezwykle szeroki, jednak bardzo częste stosowanie lecznictwie na przestrzeni wielu lat doprowadziło do wzrostu ilości szczepów opornych [5, 7].



Rysunek 2. Doksycyklina[5]

Tylozyna (Rysunek 3) to antybiotyk makrolidowy stosowany w weterynarii. Wykazuje bardzo szerokie spektrum działania wobec bakterii gram dodatnich, natomiast dość ograniczone wobec bakterii gram

ujemnych. Tylozyna jest aktywna m.in. wobec: *Corynebacterium*, *Erysipelothrix*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*. W zależności od kraju posiada różne wskazania rejestracyjne. Jest stosowana m.in. pomocniczo w zakażeniach okrężnicy u małych zwierząt lub jeszcze w niektórych krajach jako promotor wzrostu w hodowli [5, 8].



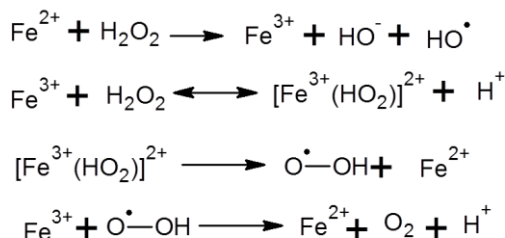
Rysunek 3. Tylozyna [5]

Ekosystemy wodne i lądowe w coraz większym stopniu cechują się obecnością antybiotyków w różnych stężeniach [9-12]. Coraz większa ingerencja człowieka w środowisko naturalne oraz brak odpowiedniego zapobiegania przedostawaniu się antybiotyków do biosfery powoduje, że z dnia na dzień w sposób wykładniczy rośnie ilość szczepów opornych na działanie antybiotyków. Powoduje to poważne problemy z leczeniem niektórych chorób, a w drastycznych przypadkach może doprowadzić do sytuacji, w której nie będzie skutecznego antybiotyku na konkretny szczep bakteryjny. W przyszłości ludzkość stanie przed wyzwaniem, jakim będzie powrót kiedyś powszechnych a dziś praktycznie nie spotykanych chorób. Już dziś powoli można zaobserwować to zjawisko. Jednak prawdziwy problem pojawi się wtedy, gdy bakterie staną się na tyle odporne, że nie podziela na nie żaden antybiotyk. Leki przeciwbakteryjne są spotykane w ściekach, wodach powierzchniowych, wodach podziemnych, glebie, roślinach, osadach i również w wodzie pitnej. Podstawowymi źródłami zanieczyszczenia antybiotykami i ich metabolitami są ścieki ze szpitali oraz odpady z zakładów farmaceutycznych, jednak największe zagrożenie stanowią antybiotyki często w formie niezmienionej pochodzące z hodowli zwierząt. Stosowane jako dodatki do pasz (np. dla ryb) w bardzo prosty sposób przedostają się w relatywnie dużych stężeniach do okolicznych wód powierzchniowych i gruntowych. Oprócz tego bogatym źródłem tego typu zanieczyszczeń są zwierzęce odchody [13-15].

1.3. Metoda Fentona

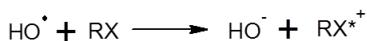
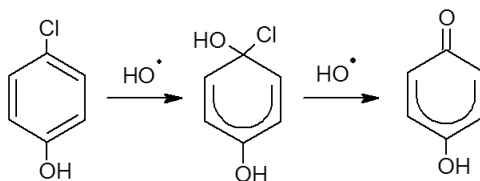
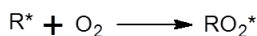
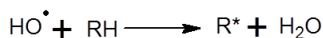
Leki przeciwbakteryjne są nieustannie dostarczane do biosfery. Procesy zaawansowanego utleniania (AOP) są wykorzystywane do zmniejszenia zanieczyszczenia nawet niewielkimi stężeniami antybiotyków. Najwyższą skutecznością cechują się technologie związane z wykorzystaniem wolnych rodników jako czynników utleniających. Szczególnie skuteczne są rodniki hydroksylowe (HO^\bullet). Ich efektywność wynika z wysokiego potencjału redoks. Utlenianie jest bardzo silne i nieselektywne [16-19].

Jedną z metod zaliczanych do AOP jest proces Fentona. Jest on inicjowany poprzez rozkład nadtlenu wodoru katalizowany jonami żelaza na drugim stopniu utlenienia. W wyniku tej reakcji powstaje rodnik hydroksylowy. Kolejne etapy procesu prowadzą do odtworzenia jonów Fe^{2+} z jonów Fe^{3+} (Rysunek 4). Optymalne pH procesu Fentona wynosi 3-4.



Rysunek 4. Mechanizm reakcji Fentona [16]

Skuteczność procesu zależy od składu zanieczyszczeń i tego, co powstaje w wyniku reakcji utleniania. Niektóre produkty mogą prowadzić nawet do zatrzymania reakcji np. w wyniku zmiany pH.



Rysunek 5. Mechanizmy reakcji rodnikowych [16]

Rodnik hydroksylowy może reagować ze związkami organicznymi poprzez oderwanie wodoru. Powstaje rodnik alkilowy (R^{\bullet}), który szybko reaguje z cząsteczką tlenu rozpuszczonego w wodzie. W wyniku tej reakcji powstaje rodnik alkilonadtlenkowy. Jeżeli występuje niedobór tlenu w środowisku, to główną reakcją jest polimeryzacja. Może również zachodzić addycja rodników hydroksylowych do nienasyconych wiązań związków organicznych. Kolejny ze znanych mechanizmów polega na przeniesieniu elektronu ze związku organicznego na rodnik hydroksylowy, co skutkuje powstaniem kationorodnika (RX^{+}) (Rysunek 5). Rodniki hydroksylowe reagując z organicznymi zanieczyszczeniami mogą doprowadzić nawet do ich całkowitej mineralizacji.

Technologia prowadzenia reakcji Fentona jest bardzo prosta, co znacznie ułatwia jej wykorzystanie w praktyce. W porównaniu z innymi metodami utleniania nie dochodzi tutaj do powstawania żadnych chlorowanych pochodnych. Dodatkowo brak konieczności stosowania naświetlania UV upraszcza budowę układów reakcyjnych i umożliwia prowadzenie reakcji na dużą skalę oraz odbarwienie silnie zabarwionych zanieczyszczeń.

W pierwszej kolejności przed przeprowadzeniem reakcji Fentona doprowadza się ścieki do odpowiedniego pH. Następnie prowadzi się proces, w którym zachodzi utlenienie związków organicznych. W dalszej kolejności przeprowadza się neutralizację ścieków. Zatrzymanie reakcji zachodzi w momencie podwyższenia pH w reaktorze. Na końcu trzeba usunąć pozostałe osady, a okres ich stabilizacji jest zdecydowanie krótszy niż w przypadku innych metod. Metoda ta jest powszechnie uważana za bardzo ekologiczną i wyróżniającą się bardzo dużą efektywnością. Jednakże prowadzenie jej na dużą skalę jest dosyć kosztowane ze względu na stosowany nadtlenek wodoru.

Minusem tego procesu jest fakt, że na wydajność jego prowadzenia ma wpływ bardzo wiele czynników. Przede wszystkim ogromne znaczenie ma pH, które musi mieścić się w zakresie 3-4. Dodatkowo wpływ ma stężenie poszczególnych odczynników (siarczan VI żelaza II, nadtlenek wodoru), czas reakcji, temperatura, rodzaj utlenianych związków oraz skład jakościowy zanieczyszczeń. Nawet niewielkie odstępstwo od optymalnego rozkładu stężeń reagentów w procesie może powodować znaczne zmniejszenie efektywności procesu. Również za niskie pH powoduje problemy z otrzymaniem oczekiwanych efektów reakcji [16, 17]. Jednak największym problemem jest fakt, iż uzyskanie wysokiego stopnia mineralizacji zanieczyszczeń organicznych wymaga zastosowania stosunkowo dużych dawek reagentów, co z kolei czyni proces nieefektywnym ekonomicznie. Z drugiej strony proces Fentona może również powodować wzrost toksyczności ścieków [20, 21].

2. Cel pracy

Celem niniejszej pracy było określenie stopnia degradacji, mineralizacji i ekotoksyczności produktów reakcji po procesie Fentona. Oceniano dynamikę tego procesu poprzez analizę stopnia degradacji i mineralizacji trzech wybranych antybiotyków – Ampicyliny (AMP), Doksycykliny (DOX), Tylozyny (TYL). Jednak najważniejszym celem było znalezienie zależności pomiędzy efektywnością procesu Fentona, dawkami użytych reagentów a potencjalnie toksycznym oddziaływaniem produktów tego procesu na środowisko.

Antybiotyki i inne leki przeciwbakteryjne stanowią grupę o potencjalnie dużym zagrożeniu dla środowiska. Ich coraz powszechniejsze stosowanie i ciągle rosnąca liczba związków sprawiają, że niemal na całym świecie wykrywa się w ekosystemach wodnych śladowe ilości antybiotyków. Sądzi się, że mogą mieć one duży wpływ na środowisko naturalne, mimo iż występują w bardzo niewielkich stężeniach. Stanowią potencjalne zagrożenie dla flory i fauny, oraz również ludzi. Przez swoją aktywność i ciągle działanie na dany mikroorganizm mogą zmienić jego właściwości, co w konsekwencji może stanowić poważne zagrożenie dla danego ekosystemu. Mogą powstawać oporne na wszystkie antybiotyki szczepy chorobotwórcze i wywoływać nowe, dotąd nieznanne choroby u zwierząt i ludzi. Oczywiście przy dzisiejszym rozwoju cywilizacyjnym wydaje się niemożliwe całkowite wyeliminowanie leków przeciwbakteryjnych i ich metabolitów ze środowiska. Jednakże człowiek stosując różnego rodzaju metody oczyszczania ścieków stara się także pozbyć się tego zagrożenia. Rodzi się pytanie na ile takie metody są skuteczne i jaki wpływ mają na biocenozę produkty takich procesów.

3. Materiały i metody

3.1. Stosowane odczynniki

- Ampicylina (AMP), Sigma-Aldrich;
- Doksycyklina (DOX), Sigma-Aldrich;
- Tylozyna (TYL), Sigma-Aldrich;
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ cz.d.a. POCH;
- H_2O_2 roztwór 30% cz.d.a. POCH;
- H_2SO_4 roztwór 0,1 mmol/l, cz.d.a. POCH;
- NaOH roztwór 0,1 mmol/l, cz.d.a. POCH;
- Testy kuwetowe OWO LCK385 (3-30 mg/l C), HACH LANGE;
- CH_3CN , do HPLC, POCH;
- Pepton sojowy, Sigma-Aldrich;

- Chlorowodorek tetrazoliny, roztwór 1%, cz.d.a. POCH;
- Próbką wody z rzeki Brynica,
- Próbką efluentu, oczyszczonych ścieków z przemysłowej oczyszczalni ścieków komunalnych.
- Próbkę wody rzecznej i próbki efluentu pełniące rolę inokulum po pobraniu były zamrożone i przechowywane w temperaturze $< -18^{\circ}\text{C}$.

3.2. Przebieg eksperymentu

Przed rozpoczęciem eksperymentu inokulum rozmrażano w ciągu 1 godziny w ciepłarnie, w temperaturze 30°C . Jednocześnie w wodzie redestylowanej przygotowano następujące roztwory:

- FeSO_4 o stężeniu $1,0\text{mmol/l}$ z H_2SO_4 ($0,1\text{ mol/l}$)
- Ampicyliny o stężeniu 100 mg/l
- Doksycykliny o stężeniu 50 mg/l
- Tylozyny o stężeniu 200 mg/l .

Roztwory te nie były przechowywane dłużej, niż 2 godziny. Stężenia antybiotyków wykorzystywane w eksperymencie ustalono na podstawie wcześniejszych badań nad wrażliwością inokulum na te leki.

W dalszej kolejności sporządzono 2% roztwór peptonu sojowego z dodatkiem $100\ \mu\text{l}$ chlorowodoru tetrazoliny. Tak sporządzony roztwór posłużył jako pożywka dla bakterii i umożliwił kolorymetryczną obserwację aktywności mikrobiologicznej w badanych próbkach. Do analizy wzrostu mikroorganizmów wykorzystano programu MARA® (NCIMB).

Następnie do sześciu probówek odmierzone po 10 ml roztworów każdego z antybiotyków, a do trzech 10ml wody destylowanej. Do każdej z osiemnastu probówek z antybiotykami oraz trzech z wodą dodano po $100\ \mu\text{l}$ roztworu FeSO_4 . Następnie roztwory doprowadzono za pomocą H_2SO_4 do $\text{pH} = 3$. pH próbek kontrolowano za pomocą Multimetru HD22569.2 (Delta OHM) z elektrodą kombinowaną KP – 30 i czujnikiem temperatury.

Do tak przygotowanego zestawu następnie dodawano według schematu świeżo przygotowany roztwór nadtlenu wodoru o stężeniu $0,3\%$, tak aby otrzymać następujące jego docelowe stężenia: 0mmol/l ; $0,5\text{mmol/l}$; $1,0\text{mmol/l}$; $2,5\text{mmol/l}$; 5mmol/l ; 10mmol/l ; 20mmol/l . Zatrzymanie procesu Fentona następowało po 30 min poprzez dodanie do każdej z próbek po $100\ \mu\text{l}$ roztworu NaOH o stężeniu $0,1\text{ mol/l}$. Następnie próbki odwirowano (10 min , 4000 RPM).

3.3. Analiza badanych antybiotyków

Aby ocenić efektywność procesu Fentona, stężenia badanych antybiotyków w próbkach roztworów przed i po procesie oznaczano metodą HPLC (YL9100HPLC System: degazer YL9101, pompa binarna YL9111, termostat YL9130, UV/VIS detektor YL9120, autosampler SHLA84000, Lab Alliance, kolumna: Vydac C-18, 5 μ m, 250 \times 2.1 mm). Zastosowano procedurę opisaną przez Adamek i wsp. [18].

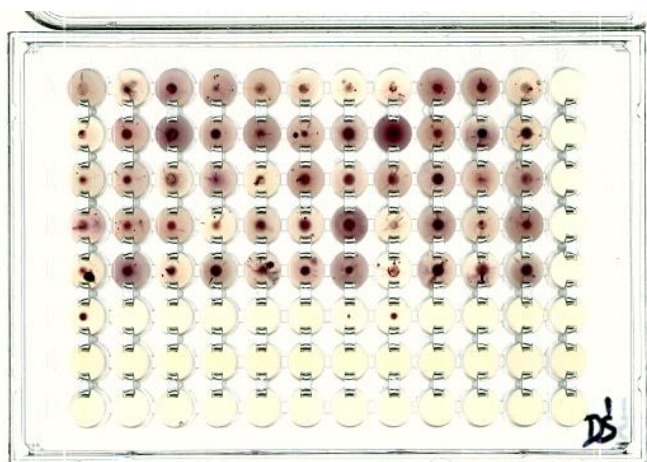
Stopień mineralizacji próbek oceniano na podstawie zmian stężenia ogólnego węgla organicznego (OWO) oznaczanego w próbkach metodą Lange. Wykorzystywano w tym celu komercyjne testy kuwetowe OWO LCK385 (3-30 mgC/l; HACH LANGE), a rezultaty odczytywano z użyciem spektrofotometru VIS DR 3900, (HACH LANGE).

3.4. Oznaczanie toksyczności badanych próbek

W celu oceny ekotoksyczności badanych próbek wykorzystano 96 dołkowe płytki mikrotitracyjne z pożywką z peptonu sojowego (2%) z chlorowodorkiem tetrazoliny (0,02%).

Z każdej z badanych próbek pobierano po 5 ml roztworu, następnie dodawano do niego po 0,1 g stałego peptonu sojowego i po 100 μ l roztworu tetrazoliny. Tak przygotowane próbki po wyjałowieniu za pomocą mikrofiltracji przez sączek CA 0.20 (LLG GmbH) nanoszono na płytki mikrotitracyjne w poziomych rzędach (każda próbka do 12 dołek). Ostatni rząd na płytce zawierał wyłącznie pożywkę z chlorowodorkiem tetrazoliny i odczynnikiem Fentona (1,0 mmol/l FeSO_4 i 0,5 mmol/l H_2O_2) uprzednio kondycjonowanym przez 30 min. Rząd ten stanowił kontrolę wzrostu mikroorganizmów. 11 pionowych rzędów na płytce po nałożeniu wszystkich próbek szczepiono inokulum z wody rzecznej (po 30 μ l na dołek) lub z efluentu (po 15 μ l na dołek) za pomocą pipety wielokanałowej. Rząd 12 pozostał nie zaszczerpiony – stanowił kontrolę sterylności próby. Wszystkie opisane wyżej czynności wykonywano w komorze laminarnej (Alpina). Zaszczepione płytki umieszczano w inkubatorze (PBI Brand) na okres 24 h. Temperatura inkubacji wynosiła 30°C. Przy zastosowanej procedurze dla każdego stężenia nadtlenu wodoru i jednego antybiotyku wykonano 11 powtórzeń.

Na rysunku 6 przedstawiono przykładowy skan płytki titracyjnej uzyskanej po degradacji DOX i szczepionej za pomocą efluentu.



Rysunek 6. Przykładowa płytką mikrotitracyjną [opracowanie własne]

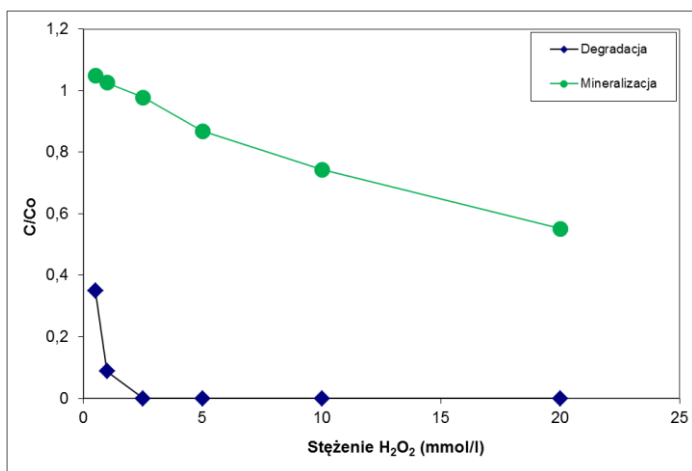
4. Omówienie wyników i dyskusja

Zależność pozostałego stężenia badanych antybiotyków od stężenia nadtlenu wodoru (w eksperymencie zastosowano stałe stężenie FeSO_4 wynoszące 1,0mmol/l) przedstawiono na wykresach 2-4.

Skuteczność badanej metody w usuwaniu ze środowiska antybiotyków wydaje się być bardzo wysoka. W każdym przypadku stężenie antybiotyku spada niemalże do zera przy dawce nadtlenu wodoru mniejszej niż 5 mmol/l.

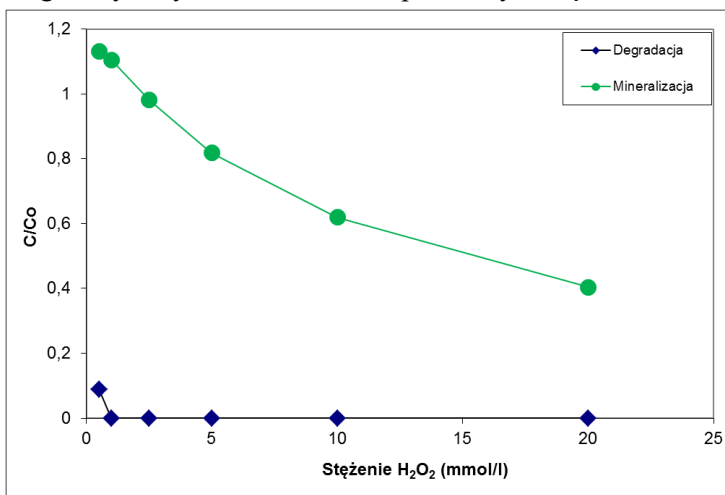
Wyniki z przeprowadzonej mineralizacji również zwizualizowano na wykresach 2-4. Pokazują one, że efektywność usuwania związków organicznych w trakcie trwania reakcji Fentona nie jest tak wysoka jak sama degradacja antybiotyków. Pozwala to na stwierdzenie, że w procesie utleniania badanych związków tworzą się bliżej nieokreślone związki organiczne, których usunięcie wymaga znacznie większej ilości nadtlenu wodoru. Stopień mineralizacji waha się pomiędzy 35% a 60% w zależności od antybiotyku.

W przypadku Ampicyliny obserwujemy bardzo szybkizrost stopnia degradacji związku wyjściowego wraz ze wzrostem stężenia nadtlenu wodoru. Już po dodaniu najniższej dawki nadtlenu wodoru następuje spadek stężenia antybiotyku o 60%, aby przy stężeniu 2,5 mmol/l osiągnąć stopień degradacji bliski 99% (Wykres 2).



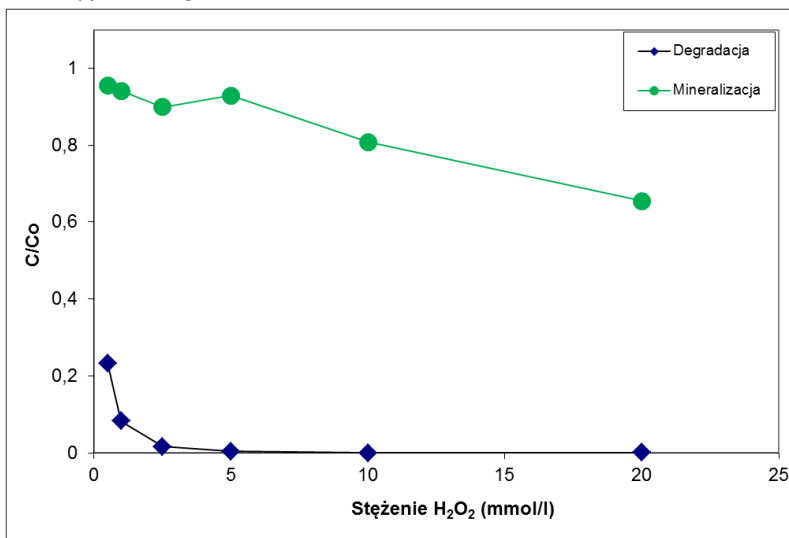
Wykres 2. Degradacja i mineralizacja Ampicyliny [opracowanie własne]

Doksycyklina cechowała się znacznie wyższą dynamiką rozkładu w porównaniu do pozostałych antybiotyków. Już najmniejsza zastosowana dawka nadtlenu wodoru spowodowała, że jej stężenie już spadło o 90%. Również mineralizacja na tle pozostałych związków była na wyższym poziomie. Zawartość związków organicznych w próbce zmniejszyła się o 40% (Wykres 3). Jest to najprawdopodobniej spowodowane faktem, iż roztwór tego antybiotyku miał niższe od pozostałych stężenie masowe.



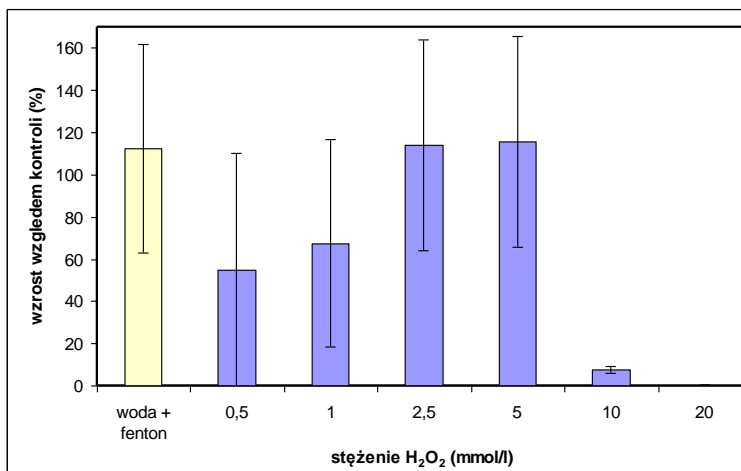
Wykres 3. Degradacja i mineralizacja Doksycykliny [opracowanie własne]

Proces degradacji Tylozyny również zachodził w bardzo wysokim stopniu. Już przy pierwszej dawce nadtlenu wodoru w próbce zostało tylko 10% wyjściowej zawartości antybiotyku. Jednakże szybkość zachodzenia mineralizacji była zdecydowanie niższa niż dla pozostałych związków. Prawdopodobnie mogło to wynikać z wyższego od pozostałych stężenia wyjściowego roztworu.

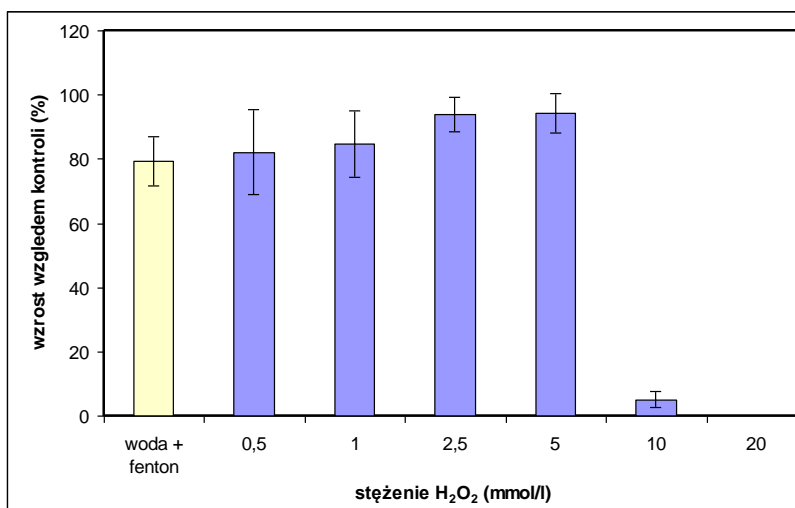


Wykres 4. Degradacja i mineralizacja Tylozyny [opracowanie własne]

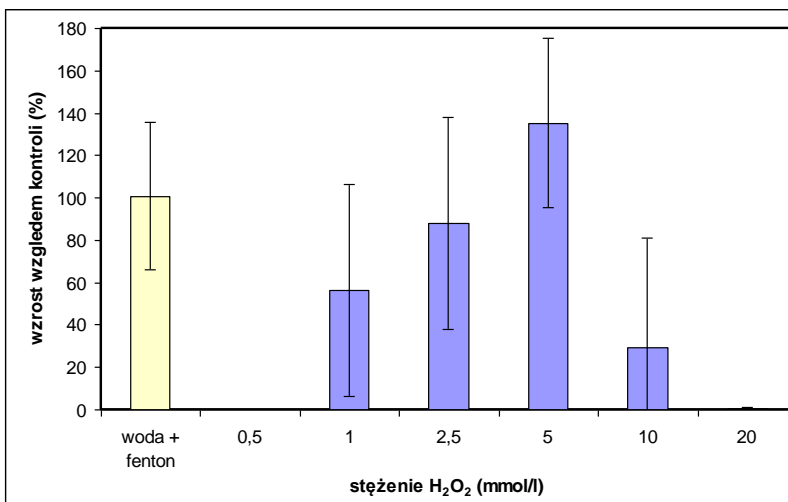
Rezultaty oceny ekotoksyczności produktów reakcji metodą Fentona przedstawiono na poniższych wykresach (Wykres 5-10). Można stwierdzić, że najwyższy wzrost mikroorganizmów nastąpił dla stężeń nadtlenu wodoru w zakresie 1-5 mmol/l. Świadczy to o tym, że toksyczność w tym przypadku jest najniższa. Powyższa prawidłowość była zbliżona w przypadku wszystkich użytych antybiotyków. Niższy wzrost w przypadku stężenia 0,5 mmol/l może świadczyć o tym, że taka ilość nadtlenu wodoru nie jest wystarczająca do rozłożenia antybiotyków i ich aktywność nadal jest zachowana. Natomiast stężenia powyżej 10 mmol/l sprawiły, że wzrost bakterii był minimalny. Takie warunki przeprowadzenia reakcji są toksyczne dla mikroorganizmów. Toksycznością może wykazywać się nadtlenek wodoru, ale także niewykluczone, że któreś z produktów rozkładu antybiotyków są aktywne wobec bakterii.



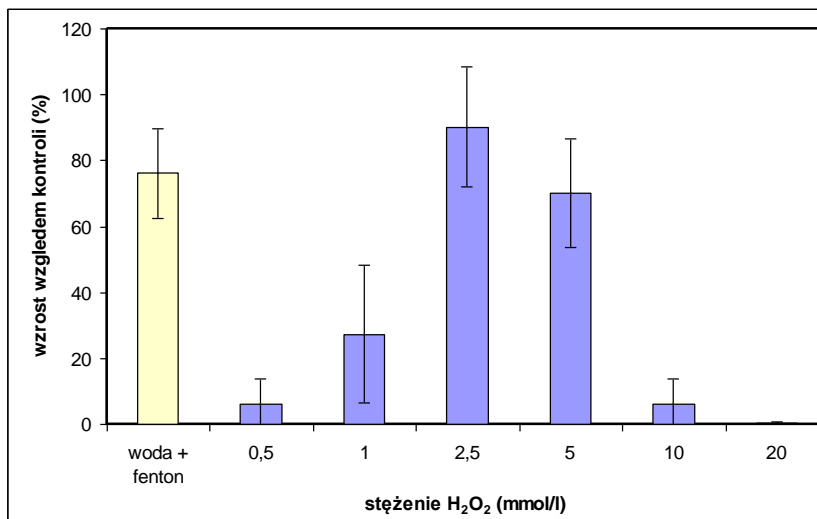
Wykres 5. Wzrost mikroorganizmów pochodzących z rzeki Brynica względem kontroli w zależności od stężenia nadtlenu wodoru dla Ampicyliny [opracowanie własne]



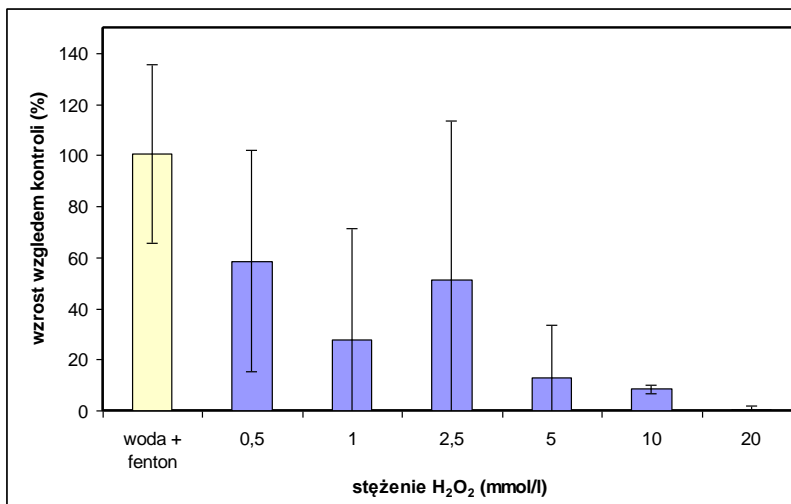
Wykres 6. Wzrost mikroorganizmów pochodzących z oczyszczonych ścieków komunalnych względem kontroli w zależności od stężenia nadtlenu wodoru dla Ampicyliny [opracowanie własne]



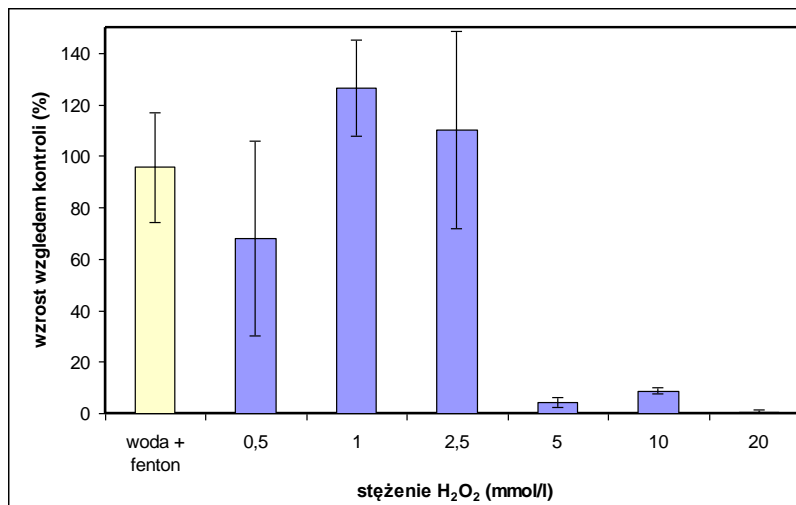
Wykres 7. Wzrost mikroorganizmów pochodzących z rzeki Brynica względem kontroli w zależności od stężenia nadtlenu wodoru dla Doksycykliny [opracowanie własne]



Wykres 8. Wzrost mikroorganizmów pochodzących z oczyszczonych ścieków komunalnych względem kontroli w zależności od stężenia nadtlenu wodoru dla Doksycykliny [opracowanie własne]



Wykres 9. Wzrost mikroorganizmów pochodzących z rzeki Brynica względem kontroli w zależności od stężenia nadtlenku wodoru dla Tylozyny [opracowanie własne]



Wykres 10. Wzrost mikroorganizmów pochodzących z oczyszczonych ścieków komunalnych względem kontroli w zależności od stężenia nadtlenku wodoru dla Tylozyny [opracowanie własne]

5. Wnioski

Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że metoda Fentona jest wysoce efektywna jeśli chodzi o usuwanie ze środowiska antybiotyków. W każdym z badanych przypadków, stężenia leków ulegały obniżeniu w stopniu znaczącym. Tak wysoka efektywność degradacji antybiotyków sprawia, że wydajność oczyszczania wody za pomocą reakcji Fentona może być bardzo wysoka.

W badaniach wykazano, że w trakcie 30 minut trwania reakcji, przy zastosowanych dawkach nadtlenu wodoru i FeSO_4 nie uzyskano całkowitej mineralizacji związków organicznych. Nadal w wodzie pozostawały organiczne produkty rozkładu antybiotyków.

Dodatkowo stwierdzono, że duży wpływ na przebieg procesu ma stężenie nadtlenu wodoru. Zbyt mała ilość tego odczynnika w mieszaninie reakcyjnej sprawia, że degradacja antybiotyku zachodzi w niewysatraczający sposób i nadal pozostaje on aktywny wobec mikroorganizmów. Natomiast zbyt duże stężenie nadtlenu wodoru sprawia, że produkty procesu Fentona są silnie ekotoksyczne. Z całą pewnością w stężeniu powyżej 10 mmol/l to nadtlenek wodoru sprawia, że proces staje się szkodliwy dla środowiska. Jednakże istnieje duże prawdopodobieństwo, że któreś z produktów rozkładu antybiotyków przy nadmiarze nadtlenu wodoru również wykazują aktywność przeciwbakteryjną i zarazem są toksyczne dla środowiska. W zastosowanych przez nas warunkach najbezpieczniejszy dla ekosystemu wydaje się być zakres stężeń nadtlenu wodoru od 1 do 5 mmol/l.

Badania pokazują jak ważne są stężenia reagentów. Tylko niewielki zakres stężeń gwarantuje względne bezpieczeństwo dla środowiska naturalnego oraz zadowalającą efektywność. Dlatego też ważne jest, aby parametry procesu Fentona dobierać precyzyjnie do składu i właściwości ścieków.

Istotne jest również, że zwiększanie dawki nadtlenu wodoru w celu poprawy efektywności mineralizacji zanieczyszczeń jest niekorzystne z punktu widzenia ekotoksyczności produktów badanego procesu.

Literatura

1. Le-Minh, N., Khan, S.J., Drewes, J.E., Stuetz, R.M. *Fate of antibiotics during municipal water recycling treatment processes*, Water Research., 44 (15) (2010), s. 4295-4323
2. Cha, J.M., Yang, S., Carlson, K.H. *Trace determination of B-lactam antibiotics in surface water and urban wastewater using liquid chromatography combined with electrospray tandem mass spectrometry*, Journal of Chromatography., 1115 (2006), s. 46-57

3. Bager F., Birk T., Høg B.B. *Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark*, Danmap 2014., s. 28-30
4. Markiewicz Z, Kwiatkowski Z, *Bakterie, antybiotyki, lekooporność*, Warszawa PWN (2012), s. 1-8,108,117-118,133-134,163-164,225-227
5. Janiec W. *Kompendium farmakologii*, Warszawa PZWL (2010), s.476-503
6. Soltani J., Poorabbas B., Miri N., Mardaneh J. *Health care associated infections, antibiotic resistance and clinical outcome: A surveillance study from Sanandaj, Iran*, World J Clin Cases., 2016 Mar 16;4 (3), s. 63-70
7. Anderson T.R., Marquart M.E., Janorkar A.V. *Effective release of a broad spectrum antibiotic from elastin-like polypeptide-collagen composite*, J Biomed Mater Res A. 2015 Feb;103(2)., s. 782-900
8. Entorf M., Feßler A.T., Kaspar H., Kadlec K., Peters T., Schwarz S. *Comparative erythromycin and tylosin susceptibility testing of streptococci from bovine mastitis*, Vet Microbiol., (2015)
9. Al Aukidy M., Verlicchi P., Jelic A., Petrovic M., Barceló D. *Monitoring release of pharmaceutical compounds: occurrence and environmental risk assessment of two WWTP effluents and their receiving bodies in the Po Valley, Italy*, Sci Total Environ., 2012, 438, s. 15-25
10. Zuccato E., Castiglioni S., Bagnati R., Melis M., Fanelli R. *Source, occurrence and fate of antibiotics in the Italian aquatic environment*, J Hazard Mater., 2010, 179, s. 1042-1048
11. Gros M., Petrović M., Barceló D. *Wastewater treatment plants as a pathway for aquatic contamination by pharmaceuticals in the Ebro River Basin (Northeast Spain)*, Environ Toxicol Chem., 2007, 26, s. 1553-1562
12. Lucas D., Badia-Fabregat M., Vicent T., Caminal G., Rodríguez-Mozaz S., Balcázar J.L., Barceló D. *Fungal treatment for the removal of antibiotics and antibiotic resistance genes in veterinary hospital wastewater*, Chemosphere., 2016 Mar 15, 152, s. 301-308
13. Watkinson A.J., Murby E.J., Costanzo S.D. *Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: implications for environmental discharge and wastewater recycling*, Water Res. 41 (2007)., s. 4164-4176
14. Chang X., Meyer M.T., Liu X., Zhao Q., Chen H., Chen J., Qiu Z., Yang L., Cao J., Shu W. *Determination of antibiotics in sewage from hospitals, nursery and slaughter house, wastewater treatment plant and source water in Chongqing region of Three Gorge Reservoir in China*, Environ Pollut., (2010) 158., s. 1444-1450
15. Nikolaou A., Méric S., Fatta D. *Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments*, Anal. Bioanal. Chem., 387 (2007), s. 1225-1234
16. Rozas O., Contreras D., Mondaca A., Perez-Moyac M., Mansilla D. *Experimental design of Fenton and photo-Fenton reactions for the treatment of ampicillin solutions*, Journal of Hazardous Materials., 177 (2010), s. 1025-1030

17. Michael I., Rizzo L., McArdell C.S., Manaia C.M., Merlin C., Schwartz T., Dagot C., Fatta-Kassinos D. *Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment*, A review. 2013, s. 984-985
18. Adamek E., Baran W., Szoltysek-Boldys I., Sobczak A. *Efektywność procesów biodegradacji zastosowanych do usuwania leków przeciwbakteryjnych ze ścieków i wody rzecznej*, Proceedings of ECOpole., 2015, 9(1), s. 155-162
19. Casado J., Fornaguera J., Galán M.I. *Mineralization of Aromatics in Water by Sunlight-Assisted Electro-Fenton Technology in a Pilot Reactor*, Environ. Sci. Technol. 2005, 39 (6), s. 1843-1847
20. Barhoumi N., Oturan N., Olvera-Vargas H., Brillas E., Gadri A., Ammar S., Oturan M. *Pyrite as a sustainable catalyst in electro-Fenton process for improving oxidation of sulfamethazine*. Kinetics, mechanism and toxicity assessment, Water Research., 94 (2016), s. 52-61
21. Cataláa M., Domínguez-Moruecoa N., Migensa A., Molinab R., Martínezb F., Valcárcelc Y., Mastroiannid N., López de Aldad M., Barcelód D., Segurab Y. *Elimination of drugs of abuse and their toxicity from natural waters by photo-Fenton treatment*, Science of The Total Environment., 520, s. 198-205

Ocena ekotoksyczności produktów degradacji metodą Fentona antybiotyków weterynaryjnych.

Antybiotyki są powszechnie stosowane w celu polepszenia wydajności hodowli zwierząt. W efekcie przedostają się one do biosfery, co może skutkować poważnymi zaburzeniami w stanie mikroflory bakteryjnej oraz w dalszej perspektywie zwiększeniem oporności na antybiotyki.

Celem pracy była degradacja metodą Fentona wybranych antybiotyków (Ampicyliny, Tylozyny, Doksycykliny) stosowanych w weterynarii oraz ocena ekotoksyczności produktów tego procesu.

Badania prowadzono w obecności stałej dawki FeSO_4 oraz gradientu stężeń H_2O_2 . Ekotoksyczność oceniano z wykorzystaniem testu płytkowego z pożywką szczepioną wodą zawierającą bakterie pochodzącą z rzeki Brynicy oraz efluentem. Równocześnie w próbkach oceniano stopień degradacji i mineralizacji badanych antybiotyków.

Stwierdzono, że stosowanie zbyt niskich stężeń H_2O_2 nie powoduje całkowitej degradacji antybiotyków, które zachowują swoją toksyczność wobec bakterii. Z drugiej strony produkty reakcji Fentona prowadzonej przy wyższych stężeniach H_2O_2 powodują silne zahamowanie wzrostu mikroorganizmów, co może świadczyć o ich potencjalnej ekotoksyczności. Natomiast użycie optymalnych stężeń reagenta skutkuje wysokim stopniem degradacji antybiotyku. W tym przypadku produkty reakcji nie są ekotoksyczne mimo niewielkiego stopnia mineralizacji badanych próbek.

Reasumując niezwykle ważny jest odpowiedni dobór stężeń reagentów procesu Fentona, aby zminimalizować negatywny efekt środowiskowy a dodatkowo obniżyć jego koszty.

Słowa kluczowe: Antybiotyki, Metoda Fentona, Ekotoksyczność

Evaluation of toxicity of the degradation products of veterinary antibiotics by Fenton method.

Antibiotics are commonly use to improve the efficiency of animal breeding. As a result, they penetrate into the biosphere, which may result in serious disturbances in the stock of the bacterial microflora and increase the long term resistance to antibiotics.

The aim of this study was the degradation by Fenton method selected antibiotics (Ampicillin, Tylosin, Doxycycline) used in veterinary medicine and the assessment of the ecotoxicity of this process products.

The study was conducted in the presence of a fixed dose of FeSO_4 and H_2O_2 concentration gradient. Ecotoxicity was assessed by using a test plate with medium grafted water containing the bacteria coming from the Brynica river and effluent. At the same time the samples assessed for degradation and mineralization of the tested antibiotics.

It has been found that the use of very low concentrations of H_2O_2 doesn't result in complete degradation antibiotics that retain their toxicity against bacteria. On the other hand, products of Fenton reaction carried out at higher concentrations of H_2O_2 cause strong inhibition of microbial growth, which may indicate their potential ecotoxicity. And the use of optimal concentrations of the reactant results in a high degree of degradation of the antibiotic. In this case the reaction products aren't ecotoxic despite a small degree of mineralization of samples tested.

To sum up, it is extremely important appropriate selection of Fenton process reagents concentration to minimize the adverse environmental effect and further reduce costs.

Keywords: Antibiotics, Fenton method, Ecotoxicity

Krystian Jakubczak¹, Michał Kania¹, Tomasz Zawila¹, Robert D. Wojtyczka²,
Tomasz J. Wąsik²

Ocena wrażliwości na antybiotyki aminoglikozydowe i ryfampicynę szczepów *Staphylococcus epidermidis* tworzących i nietworzących biofilmu

1. Wstęp

Staphylococcus epidermidis jest najczęściej spotykanym przedstawicielem grupy gronkowców koagulazujących (CoNS). Stanowi składnik mikrobiomu skóry, niezbędny do utrzymania homeostazy. Powszechne występowanie *S. epidermidis* nie tylko znacznie zwiększa ryzyko zakażenia szpitalnego, związanego z zakażeniem cewnika moczowego, cewnika naczyniowego czy implantu, ale także znacząco utrudnia postawienie jednoznacznej diagnozy, gdyż jest także jednym z najczęściej występujących zanieczyszczeń mikrobiologicznych materiałów klinicznych.

Gronkowiec naskórkowy jest patogenem, który powoduje poważne infekcje w zależności od predyspozycji pacjentów. Czynniki predysponujące do zakażenia takie jak wcześniactwo, immunosupresja, nabyte niedobory odporności oraz przejściowa neutrocytopenia wskazują na oportunistyczną naturę zakażeń *S. epidermidis*. Ponadto ryzyko infekcji zwiększa się wielokrotnie wraz z wprowadzaniem do ustroju oprzyrządowania medycznego [1-5]. *S. epidermidis* może powodować zakażenia o charakterze uogólnionym, które mogą manifestować się bakteriemią, posocznicą czy wstrząsem septycznym. Najczęstszymi zakażeniami są zakażenia układu krwionośnego spowodowane przez wprowadzane cewniki naczyniowe [4-6].

S. epidermidis jest istotną przyczyną zakażeń implantów stawowych. Brak nieinwazyjnych możliwości ich leczenia oraz wzrost oporności szczepów na antybiotyki bardzo często wymaga ponownej interwencji chirurgicznej.

¹ jakubczak_krystian@wp.pl, Koło STN przy Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii i Wirusologii Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

² Katedra i Zakład Mikrobiologii i Wirusologii Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

Szczególnie poważnym powikłaniem zakażenia CoNS jest infekcyjne zapalenie wsierdza (IZW). Około 80 procent tych zakażeń powodowane jest przez szczepy *S. epidermidis* [1, 4]. W leczeniu infekcyjnego zapalenia wsierdza wykorzystuje się szereg różnych antybiotyków, natomiast w wyniku wzrostu oporności szczepów coraz częściej konieczne jest wdrożenie leczenia chirurgicznego, które stanowi zarówno osobną formę leczenia, jak i uzupełnienie antybiotykoterapii. Pomimo tego antybiotykoterapia wciąż pozostaje głównym narzędziem w leczeniu IZW. Obecne rekomendacje leczenia w przypadku zakażenia gronkowcem obejmują zastosowanie wankomycyny w połączeniu z gentamycyną, która należy do grupy antybiotyków aminoglikozydowych. Terapia skojarzona zwiększa skuteczność drobnoustrojów oraz zapobiega uodpornieniu szczepów na antybiotyki [7]. W leczeniu zapalenia wsierdza na protezach zastawek serca wywołanego przez gronkowce koagulazoujemne, gentamycyna może być także stosowana w połączeniu z wankomycyną lub ryfampicyną [8].

Wraz z zwiększoną liczbą zakażeń wywoływanych przez *S. epidermidis* rośnie, także problem jego lekooporności, co ściśle związane może być ze zdolnościami drobnoustrojów do tworzenia biofilmu [9-11].

Biofilm jest wielokomórkowym tworem złożonym z drobnoustrojów należących do jednego lub wielu gatunków czy rodzajów, przyczepionym do powierzchni biotycznych lub abiotycznych, które są zatopione w zewnątrzkomórkowej macierzy wyprodukowanej przez ich populację. Zdolności kolonizacji różnych powierzchni drobnoustroje zawdzięczają swoim właściwościom adherencyjnym komórek, a stabilizowanie struktury biofilmu związane jest z możliwością produkowania pozakomórkowej substancji polimerowej – EPS (*extracellular polymeric substance*). Substancję tę budują polisacharydy, lipidy, kwasy nukleinowe, surfaktanty, białka oraz woda. Skład zewnątrzkomórkowych polimerów biofilmu jest bardzo zróżnicowany i zależy od gatunku bakterii [12-15].

Rozwój antybiotyków aminoglikozydowych rozpoczął się w 1943 odkryciem streptomycyny. Jednak to gentamycyna szybko stała się antybiotykiem z wyboru przy leczeniu zakażeń wywołanych pałeczkami Gram-ujemnymi. Pomimo to aminoglikozydy (szczególnie gentamycyna) wykorzystywane są również w terapii skojarzonej z wankomycyną lub ryfampicyną, przy zakażeniach sztucznych zastawek serca wywołanych przez Gram-dodatnie *S. epidermidis*.

Typowa cząsteczka aminoglikozydu składa się z aminocukrów połączonych z heksozą wiązaniem glikozydowym. Po wnikięciu do komórki aminoglikozydy wiążą się z rybosomalną podjednostką 30S uniemożliwiając odczyt informacji genetycznej niesionej przez mRNA i tym samym hamując syntezę białek. Jednak zanim nastąpi powstanie wiązania antybiotyk-podjednostka 30S, antybiotyk musi zostać przetransportowany

do wnętrza komórki na zasadzie transportu czynnego zależnego od energii i od obecności tlenu. U bakterii Gram-dodatnich transport ten zostaje nasilony przy udziale substancji hamujących syntezę ściany komórkowej np. antybiotyków β -laktamowych [8].

Działanie antybiotyków aminoglikozydowych zależy od ich stężenia. Okres półtrwania w surowicy ludzkiej wynosi około 2 godzin i wykazuje dużą zmienność osobniczą. Aminoglikozydy ponadto wykazują działanie poantybiotykowe, mogą kumulować się w nerkach i wykazywać nefrotoksyczność [8].

Ryfampicyna to półsyntetyczny antybiotyk będący pochodną ryfamycyny SV. Działanie jej opiera się na blokowaniu polimerazy RNA zależnej od DNA bakterii. Aktywność biologiczna ryfamycyny znalazła zastosowanie na początku w leczeniu gruźlicy, jednak infekcje wywołane przez gronkowce były jednymi z pierwszych zakażeń leczonych ryfamycyną zaraz po stosowaniu antybiotyku na *Mycobacterium tuberculosis* [16]. Przypuszcza się, że ryfampicyna ma właściwości anti-biofilmowe wykazując zdolność do przenikania do wnętrza biofilmu gronkowcowego wraz ze skutecznym niszczeniem jego struktur. Antybiotyk ten stosuje się w skojarzeniu z innymi lekami zwłaszcza w przypadku zakażeń związanych z bakteriami z rodziny *Staphylococcus* [17].

2. Cel pracy

Celem pracy było określenie wrażliwości na wybrane antybiotyki aminoglikozydowe oraz ryfampicynę wobec szczepów *Staphylococcus epidermidis*, wyizolowanych z łożyska naczyniowego, w zależności od fenotypowej zdolności do tworzenia biofilmu w badaniach *in vitro*.

3. Materiały i metody

Badania mikrobiologiczne przeprowadzono w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii i Wirusologii Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach.

3.1. Materiał

Do badania wykorzystano 38 szczepów *Staphylococcus epidermidis* wyizolowanych z próbek krwi pacjentów hospitalizowanych w szpitalach z terenu województwa śląskiego, należących do kolekcji drobnoustrojów Katedry i Zakładu Mikrobiologii i Wirusologii SUM oraz dwóch szczepów wzorcowych *S. epidermidis* ATTC35894 i *S. epidermidis* ATCC12228 (odpowiednio, tworzącego i nietworzącego biofilmu).

3.2. Ocena fenotypowa występowania biofilmu wśród szczepów *S. epidermidis*

Do fenotypowego określania zdolności tworzenia biofilmu użyto zmodyfikowanej metody Christensena i wsp. [18] z użyciem fioletu krystalicznego.

Ze szczepów przechowywanych w temperaturze -78°C dokonano posiewu na podłoże agarowe z dodatkiem 5% krwi baraniej (AK) w celu sprawdzenia czystości szczepów, a następnie na podłoże TSB (Tryptic Soy Broth). Szczepy inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C . Po inkubacji rozcieńczono zawiesinę w podłożu płynnym TSB w stosunku 2:3.

Na sterylne płytki hodowlane do studzienek wprowadzono po 100 μl płynnego podłoża TSB z 1% glukozą oraz dodano 100 μl rozcieńczonej zawiesiny bakteryjnej. Całość inkubowano w 37°C przez 24 godziny w atmosferze tlenowej. Po okresie inkubacji usuwano pożywkę z płytek i przepłukiwano trzy razy buforem fosforanowym (PBS) o $\text{pH} = 7,2$ w celu usunięcia bakterii niezwiązanych z płytką. Następnie umieszczono w dołkach titracyjnych 150 μl 1% roztworu fioletu krystalicznego i całość poddano 30 minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej. Następnie płytki płukano czterokrotnie jałową wodą dejonizowaną i suszono. Do studzienek dodawano 100 μl kwaśnego izopropanolu rozpuszczano wybarwiony biofilm przez 30 minut, a następnie dokonywano pomiaru absorbancji przy długości fali 492 nm, przy użyciu czytnika mikropłytek MICROSCAN SX. Oznaczenia przeprowadzono trzykrotnie, a wyniki podawano jako średnią wartość absorbancji.

3.3. Genotypowa ocena zdolności tworzenia biofilmu

Molekularna ocena zdolności syntezy biofilmu opierała się na ocenie występowania genów operonu *icaADBC*. Analizę obecności genów operonu *icaADBC*, techniką PCR prowadzono przy użyciu starterów opisanych przez Zehbur i wsp.[19] oraz Diamond i wsp. [20] zgodnie z następującą metodyką. Reakcję PCR przeprowadzano przy użyciu zestawu 10xPCR RED Kit (BLIRT, Gdańsk). Amplifikację prowadzono według parametrów podanych w tabeli 1.

Za wynik pozytywny uznawano dla genu *icaA* – obecność produktu o wielkości 814 pz, dla genu *icaB* – obecność produktu o wielkości 526 pz, dla genu *icaC* – obecność produktu o wielkości 989 pz oraz dla genu *icaD* – obecność produktu o wielkości 371 pz. Jako kontrolę pozytywną użyto szczep *S. epidermidis* ATTC35894 posiadającego operonu *icaADBC* natomiast, jako kontrolę negatywną szczepu *S. epidermidis* ATCC12228, nie posiadającego operonu *icaADBC*.

Tabela 1. Warunki reakcji PCR dla genów operonu *icaADBC*

| etap | temperatura | czas | liczba cykli |
|------------------------|--|-----------|--------------|
| wstępna denaturacja | 95 ⁰ C | 3 minuty | 1 |
| denaturacja | 95 ⁰ C | 30 sekund | 30 |
| przyłączanie starterów | 60 ⁰ C dla genu <i>icaA</i> 59 ⁰ C dla genów <i>icaB</i> <i>i icaD</i> 45 ⁰ C dla genu <i>icaC</i> | 60 sekund | |
| wydłużanie starterów | 72 ⁰ C | 90 sekund | |
| wydłużanie końcowe | 72 ⁰ C | 3 minuty | 1 |

Detekcję produktu prowadzono poprzez elektroforezę agarozową w 1,5% żelu w 0,5x TBE, przy napięciu (4V/cm) 110V przez 2,5 godziny

3.4. Badanie lekowrażliwości szczepów *S. epidermidis*

Badanie lekowrażliwości przeprowadzono metodą krążkowo-dyfuzyjną zgodnie z procedurami EUCAST [21], dla czterech antybiotyków aminoglikozydowych i ryfampicyny. Badanie przeprowadzono na podłożu Müllera-Hintona (EMAPOL) za pomocą krążków bibułowych (OXOID) z gentamycyną (CN 10 µg), amikacyną (AK 30µg), tobramycyną (TOB 10µg), netylmycyną (NET 10µg) oraz ryfampicyną (RA 5µg). Wyniki badania lekowrażliwości podano w milimetrach, jako wartość średnią z trzech pomiarów z odchyleniem standardowym. Interpretacji stref zahamowania wzrostu dokonano zgodnie ze standardami EUCAST.

4. Analiza wyników

4.1. Analiza zdolności tworzenia biofilmu przez szczepy *S. epidermidis*

W przeprowadzonych badaniach dokonano analizy fenotypowej zdolności wytwarzania biofilmu oraz genetycznych uwarunkowań do tworzenia polisacharydowej adhezyny (PIA) wśród szczepów *S. epidermidis*.

Ocena fenotypowej zdolność wytwarzania biofilmu pozwoliła podzielić badane szczepy na dwie grupy. Pierwsza grupa zawierała 23 (57,5%) szczepy *S. epidermidis* fenotypowo tworzące biofilm oraz szczep wzorcowy *S. epidermidis* ATCC35984, natomiast druga grupa, nietworząca fenotypowo biofilmu, zawierała 17 (42,5%) szczepów *S. epidermidis* oraz szczep wzorcowy *S. epidermidis* ATCC12228.

Obecność poszczególnych genów operonu *icaADBC*, stwierdzono u wszystkich 38 (100%) szczepów badanych oraz szczepu wzorcowego *S. epidermidis* ATCC35984. Brak genów operonu *icaADBC* stwierdzono tylko w przypadku szczepu wzorcowego *S. epidermidis* ATCC12228. Jednocześnie tylko 23 szczepy badane wykazywały tą zdolność fenotypowo.

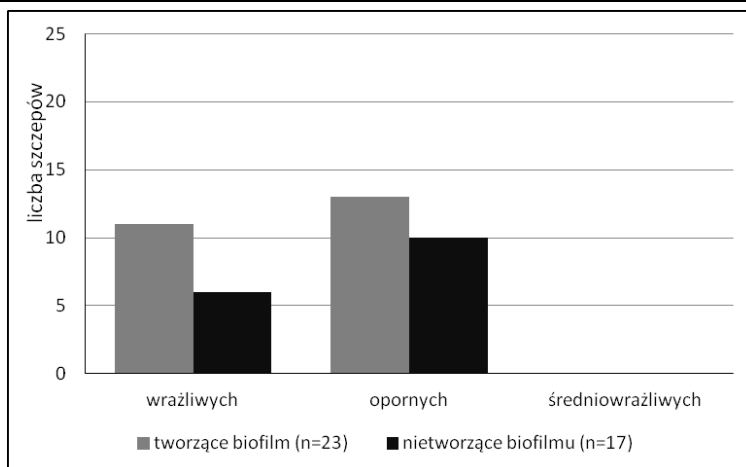
4.2. Ocena lekowrażliwości szczepów *S.epidermidis*

Wyniki oceny lekowrażliwości badanych szczepów na wybrane antybiotyki aminoglikozydowe i rifampicynę przedstawiono w tabeli 2. Jako kryterium wrażliwości, średniowrażliwości i oporności szczepów przyjęto wartości zgodnie z wymogami EUCAST (wersja 5.0, 2015).

Tabela 2. Średnie wartości stref zahamowania wzrostu badanych antybiotyków dla szczepów *S.epidermidis*

| Nr szczepu | ryfampicyna śr.± SD | amikacyna śr.± SD | gentamycyna śr.± SD | netilmycyna śr.± SD | tobramycyna śr.± SD |
|------------|------------------------|----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 1 | 46±0,58 | 30±1,53 | 0 | 25±1,53 | 14±1,15 |
| 2 | 49±0,58 | 33±4,62 | 31±2,08 | 30±1 | 18±1,53 |
| 3 | 46 | 24±2,31 | 0 | 26±1,53 | 0 |
| 4 | 47±0,58 | 46±0,58 | 43±1,15 | 42 | 46±1,53 |
| 5 | 45±1 | 21±2,08 | 0 | 31±1 | 0 |
| 6 | 48 | 37±3,06 | 0 | 38±2 | 19±1,53 |
| 7 | 46 | 32±1,53 | 15±1 | 31±1,53 | 19±1,15 |
| 8 | 46±0,58 | 15±1,15 | 0 | 0 | 0 |
| 9 | 47±1,15 | 26±1,53 | 0 | 19±2 | 0 |
| 10 | 46±1 | 36±1 | 37±1 | 41±1,15 | 20±0,58 |
| 11 | 0 | 21±3,61 | 0 | 31±1,15 | 0 |
| 12 | 47±1 | 17±0,58 | 0 | 0 | 0 |
| 13 | 50±2,52 | 18±1 | 0 | 17±0,58 | 10 |
| 14 | 39±1,15 | 31±4,58 | 26±0,58 | 27±0,58 | 29±1,15 |
| 15 | 49±1,15 | 36±4,04 | 37±1,73 | 42±1,53 | 28±2,08 |
| 16 | 44 | 38±0,58 | 35±3 | 39±1,15 | 34±2,0 |
| 17 | 46 | 33±0,58 | 31±1 | 32±1,53 | 33 |
| 18 | 47±1 | 22±3,06 | 16±3,46 | 31±1,15 | 0 |
| 19 | 48±0,58 | 30±1 | 27±1 | 26±1 | 28±1,53 |
| 20 | 47±0,58 | 38±4,04 | 41±1,15 | 37±2,52 | 43±2,31 |
| 21 | 44±2,08 | 41±1,15 | 14±2,08 | 39±1 | 22±2,89 |
| 22 | 45±1 | 33 | 29±1,15 | 29±1,15 | 30±1,73 |
| 23 | 45±0,58 | 28±1,73 | 12 | 22±1,53 | 16±2 |
| 24 | 46±2 | 24±1 | 0 | 19±2,08 | 12±0,58 |
| 25 | 46±2 | 24±1,15 | 0 | 30±1,53 | 0 |
| 26 | 41±1,15 | 36±1 | 37±1,53 | 38±0,58 | 37 |
| 27 | 46 | 35±0,58 | 0 | 31±1,73 | 21±1 |
| 28 | 46±1,15 | 41±1,15 | 29±0,58 | 29±1,15 | 30±1 |
| 29 | 46±1 | 34±3,79 | 36±0,58 | 35±1,53 | 36±1 |
| 30 | 45±1,15 | 30 | 32±3,46 | 34±1,15 | 28 |
| 31 | 43 | 36 | 0 | 27±1,24 | 15±3 |
| 32 | 45±1 | 0 | 0 | 20 | 0 |
| 33 | 45 | 26±2,31 | 17±0,58 | 34±3,06 | 0 |

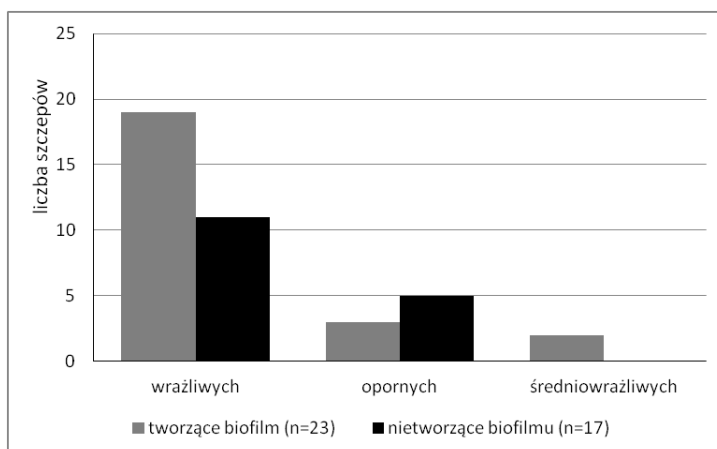
| | | | | | |
|----|----|---------|---------|---------|---------|
| 34 | 48 | 38±3,79 | 39±0,58 | 42 | 36±3,21 |
| 35 | 44 | 20±0,58 | 0 | 16±1 | 12±1,53 |
| 36 | 48 | 36 | 0 | 30 | 13±1,73 |
| 37 | 46 | 20±1,53 | 0 | 13±1,15 | 0 |
| 38 | 49 | 20±2,65 | 0 | 29±1,53 | 0 |
| 39 | 46 | 25±1 | 0 | 27±1,53 | 0 |
| 40 | 50 | 32 | 29±1 | 28±0,58 | 30±0,58 |



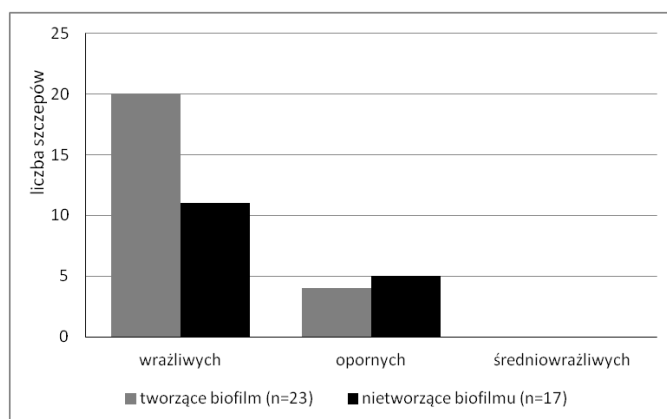
Rysunek 1. Analiza wrażliwości szczepów *S.epidermidis* na gentamycynę w zależności od zdolności do tworzenia biofilmu [opracowanie własne]

Oceniając aktywność amikacyny stwierdzono, że 31 szczepów *S. epidermidis* (77,5%) wykazywało wrażliwość, 4 szczepy (10%) wykazywały oporność, oraz stwierdzono obecności 5 szczepów (12,5%) średniowrażliwych na ten antybiotyk. Rozkład wrażliwości i oporności szczepów na amikacynę w zależności od fenotypowej zdolności tworzenia biofilmu przedstawia rys. 2.

Analizując profil wrażliwości na netylmycynę 31 szczepów (77,5%) wykazywało wrażliwość na ten aminoglikozyd oraz 9 szczepów (22,5%) było opornych. Nie stwierdzono obecności szczepów średniowrażliwych (rys.3)

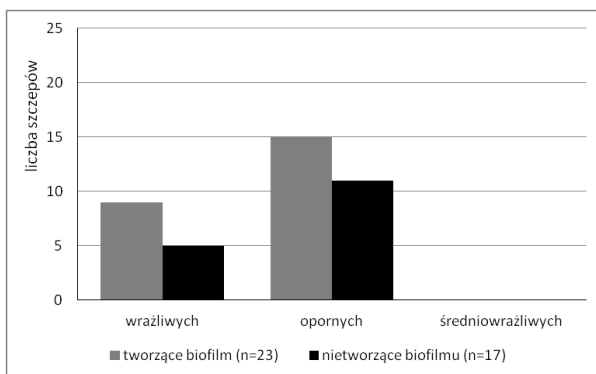


Rysunek 2. Analiza wrażliwości szczepów *S.epidermidis* na amikacynę w zależności od zdolności do tworzenia biofilmu [opracowanie własne]



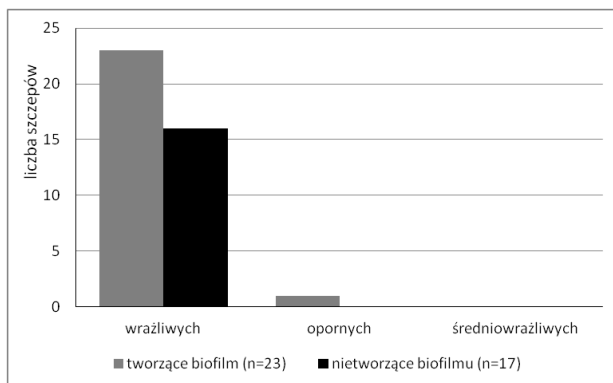
Rysunek 3. Analiza wrażliwości szczepów *S.epidermidis* na netylmycynę w zależności od zdolności do tworzenia biofilmu [opracowanie własne]

W przypadku tobramycyny 14 szczepów (35%) *S. epidermidis* wykazywało wrażliwość na tobramycynę, 26 szczepów (65%) wykazywało oporność, a także nie stwierdzono obecności szczepów średniowrażliwych. Rozkład wrażliwości i oporności szczepów na tobramycynę w zależności od fenotypowej zdolności tworzenia biofilmu przedstawia rys. 4.



Rysunek 4. Analiza wrażliwości szczepów *S.epidermidis* na tobramycynę w zależności od zdolności do tworzenia biofilmu [opracowanie własne]

Ostatnim analizowanym antybiotykiem była ryfampicyna. Oceniając profil wrażliwości szczepów *S. epidermidis* na ryfampicynę stwierdzono obecność 39 szczepów (97,5%) wrażliwych, a tylko 1 szczep (2,5%) wykazywał oporność. Nie stwierdzono także obecności szczepów średniowrażliwych (rys. 5).



Rysunek 5. Analiza wrażliwości szczepów *S.epidermidis* na ryfampicynę w zależności od zdolności do tworzenia biofilmu [opracowanie własne]

5. Podsumowanie

Stosowane biomateriały, z których wykonane są implanty medyczne przyczyniają się do wzrostu zakażeń bakteriami z rodzaju *Staphylococcus* z dużym udziałem szczepów należących do gatunku *S. epidermidis*.

Potwierdzają to badania przeprowadzone przez Deplano A. i wsp. [2] w Belgii, którzy wykazali, że z grupy 80 izolatów pochodzących z zakażeń krwi wywołanych przez CoNS większość, bo aż 76%, stanowił gatunek

Staphylococcus epidermidis. Ponadto w przeprowadzonych przez nich badaniach szczep ten w 77% wykazywał metycylinooporność (MRSE – methycilin-resistant *Staphylococcus epidermidis*) [2].

W innych badaniach prowadzonych przez Obeng-Nkrumah i wsp. [22] wykazano tylko 30% udział *S. epidermidis* w zakażeniach krwi, jednak badania te dotyczyły tylko pacjentów onkologicznych. W badaniach tych wykazano, że *S. epidermidis* był najliczniej izolowanym czynnikiem etiologicznym także w przypadku zakażeń mieszanych (głównie z *E.coli*). Wielolekooporność *S. epidermidis* stwierdzono u 25% izolatów.

Dużą rolę w przypadku zakażeń wywoływanych przez szczepy *S. epidermidis* odgrywa zdolność do tworzenia biofilmu na implantach abiotycznych, co znacznie utrudnia eradykację tych drobnoustrojów i może powodować poważne, długotrwałe infekcje. Drobnoustroje bytujące w strukturze biofilmu charakteryzują się często zmienną wrażliwością na antybiotyki, a słaba jego penetracja do wnętrza biofilmu może być przyczyną niepowodzeń terapeutycznych [6, 9, 13, 15]. Ponadto problem rozwoju mechanizmów antybiotykooporności towarzyszy współczesnej medycynie niemal od początku terapeutycznego stosowania antybiotyków.

Dlatego w naszej pracy podjęto się oceny skuteczności antybiotyków aminoglikozydowych oraz ryfampicyny na szczepy *S. epidermidis* posiadające genetycznie uwarunkowaną zdolność do tworzenia biofilmu, ale nie zawsze wykazujące ją fenotypowo. Genetyczne uwarunkowania zdolności tworzenia biofilmu zależnego od operonu *icaADBC* potwierdzono w przypadku wszystkich szczepów badanych za pomocą techniki PCR.

W kolejnym etapie badań dokonano oceny lekowrażliwości szczepów *S. epidermidis* na antybiotyki aminoglikozydowe i ryfampicynę w badaniach *in vitro*. W przeprowadzonych przez nas badaniach wśród szczepów *S. epidermidis* wyizolowanych z próbek krwi wykazano wysoką oporność szczepów *S. epidermidis* na antybiotyki aminoglikozydowe szczególnie tobramycynę i gentamycynę.

Taki rozkład wrażliwości potwierdzają badania przeprowadzone przez Maduka-Ezeh i wsp. [23]. Stwierdzono w nich, że 5 spośród 11 (45%) badanych szczepów SVC *S. epidermidis* (*small variant colony S. epidermidis*) było wrażliwych na co najmniej jeden z używanych antybiotyków aminoglikozydowych. W naszych badaniach spośród antybiotyków aminoglikozydowych najwyższą aktywność wobec szczepów *S. epidermidis* wykazywała amikacyna i netylmycyna (po 31 szczepów – 77,5%), następnie gentamycyna (16 szczepów – 40%) i tobramycyna (14 szczepów – 35%).

Wykazaną w naszych badaniach wysoką oporność (65%) na tobramycynę, potwierdzają badania Sanfilippo i wsp. [24]. W badaniach

przeprowadzonych na 741 szczepach CoNS pochodzących z terenu Francji, Niemiec, Włoch, Polski, Słowacji, Hiszpanii i Wielkiej Brytanii w latach 2010-2011, w przypadku 313 szczepów CoNS, wykazano zróżnicowaną oporność w zależności od podziału na szczepy metycylinowrażliwe (MSCoNS – 140 szczepów) oraz metycylinooporne (MRCoNS – 173 szczepów). Dla szczepów CoNS wykazano średnią oporność na tobramycynę na poziomie 39,9% w zakresie od 15% na terenie Słowacji do 75% wśród szczepów wyizolowanych w Hiszpanii. Natomiast oporność na netylmycynę i gentamycynę była niższa niż na tobramycynę. [24]. Podobne rezultaty uzyskali Blanco AR. i wsp. [25], którzy wykazali oporność na tobramycynę na poziomie 58,3%.

Według badań przeprowadzonych przez Vergara-López S. i wsp. [26] amikacyna może być tak samo aktywna wobec szczepów *S. epidermidis* jak tobramycyna i gentamycyna. W przeprowadzonych przez nas badaniach wykazano wysoką wrażliwość na ten aminoglikozyd. 77,5% szczepów *S. epidermidis* było wrażliwych na amikacynę, stwierdzono także obecność 12,5% szczepów średniowrażliwych i 10% szczepów opornych. W badaniach Nitsch-Osuch i wsp. [27] wykazano większą oporność szczepów CoNS na amikacynę, która wynosiła 21%. Jednak w badaniach prowadzone przez Brzychczy-Włoch i wsp. [28] stwierdzono, że w przypadku amikacyny, dla szczepów *S. epidermidis* izolowanych od noworodków o niskiej masie urodzeniowej oporność może sięgać nawet 60%. To wysokie zróżnicowanie w lekooporności szczepów *S. epidermidis* potwierdzają wieloletnie badania prowadzone przez Guggenheim M. i wsp. [29]. Przegląd badań lekowrażliwości przeprowadzony przez nich na przełomie lat 1986-2005 na szczepach *S. epidermidis* wyizolowanych z ran pooparzeniowych, wykazał bardzo zróżnicowaną wrażliwość na amikacynę w zakresie od 42% do 95% w zależności od okresu badań.

W przypadku netylmycyny, podobnie jak dla amikacyny, w przeprowadzonych przez nas badaniach stwierdzono obecność 77,5% szczepów wrażliwych, natomiast zaobserwowano zwiększoną częstość występowania szczepów opornych, która wynosiła 22,5% przy jedno-czesnym braku szczepów średniowrażliwych. Taki rozkład lekowrażliwości potwierdzają badania Nitsch-Osuch i wsp.[27], którzy stwierdzili obecność 21% szczepów opornych na ten aminoglikozyd. Natomiast w badaniach Li i wsp.[30] wykazano jeszcze większą wrażliwość *S. epidermidis* na netylmycynę wynoszącą 100%. Podobne wyniki wrażliwości szczepów *S. epidermidis* MRSE na netylmycyną opisali Blanco AR. i wsp. [25]. W przeprowadzonych przez nich badaniach na szczepach wyizolowanych z układu oddechowego stwierdzono 100% wrażliwość szczepów MRSE na netylmycynę. Wysoki stopień wrażliwości na netylmycynę potwierdzają

także długoletnie badania Guggenheim M. i wsp. [29], wykazując wrażliwość szczepów *S. epidermidis* na netylmycynę w zakresie od 93% do 100%.

W przeprowadzonych przez nas badaniach stwierdzono natomiast bardzo niską wrażliwość szczepów *S. epidermidis* na gentamycynę. Częstość występowania szczepów opornych wśród *S. epidermidis* oceniono na 60%. Jeszcze większą oporność na gentamycynę przedstawili w swoich badaniach Brzychczy-Włoch M. i wsp. [28], gdzie częstość występowania szczepów opornych sięgała 95%. Całkowicie odmienne wyniki przedstawiają natomiast Sahal G. i Bilkay IS. [31]. Przeprowadzone przez nich badania na szczepach wyizolowanych z różnych materiałów klinicznych pokazują, że tylko 30% szczepów jest opornych na działanie gentamycyny. W badaniach Nitsch-Osuch i wsp. [27] częstotliwość szczepów opornych była jeszcze mniejsza i wynosiła tylko 21%. Szeroki zakres oporności na gentamycynę przedstawiają natomiast długoletnie badania Guggenheim M. i wsp. [29], którzy wykazali zróżnicowaną oporność szczepów *S. epidermidis* na gentamycynę w zakresie od 18% do 65%.

W końcowym etapie badań dokonano oceny wrażliwości szczepów na ryfampicynę. Przeprowadzone przez nas badania wykazały, że szczepy *S. epidermidis* wyizolowane z próbek krwi charakteryzowała wysoka wrażliwość na ryfampicynę w badaniach *in vitro* sięgająca 98%, co może być przydatne w leczeniu skojarzonym z antybiotykami amino glikozydowymi w przypadku infekcyjnego zapalenia wsierdzia gdzie połączenie gentamycyny z ryfampicyną jest jedną z opcji terapeutycznych. Przydatność ryfampicyny w leczeniu skojarzonym potwierdzają badania Gomes F. i wsp. [32] wykazali oni, że ryfampicyna w połączeniu z gentamycyną ma bardzo szeroki zakres działania przeciwko szczepom *S. epidermidis*.

Wysoką skuteczność ryfampicyny na szczepy *S. epidermidis* potwierdzają badania Guggenheim M i wsp. [29]. W przeprowadzonych przez nich badaniach, wrażliwość szczepów CoNS na ryfampicynę w okresie 20-letnim wynosiła od 72% do 100%. Jednak są także doniesienia o występowaniu szczepów *S. epidermidis* o zmniejszonej wrażliwości na ryfampicynę. Potwierdzają to badania Shah MU. i wsp. [33], którzy stwierdzili 31,8% oporność szczepów *S. epidermidis* na ryfampicynę.

Podsumowując, przeprowadzone badania wykazały zróżnicowaną oporność szczepów *S. epidermidis* na antybiotyki aminoglikozydowe. Szczepy te charakteryzowały się wysoką opornością na tobramycynę i gentamycynę oraz wysoką wrażliwością na amikacynę i netylmycynę. Ponadto stwierdzono bardzo wysoką wrażliwość badanych szczepów na ryfampicynę. Otrzymane wyniki wydają się sugerować, iż między badanymi szczepami nie ma istotnych różnic pomiędzy szczepami

tworzącymi i nietworzącymi fenotypowo biofilmu, a ich lekowrażliwością, jednak należy zaznaczyć, że wszystkie badane szczepy należały do grupy szczepów posiadających operon *icaADBC*. Co istotne w przeprowadzonych przez nas badaniach ponad 1/3 szczepów *S. epidermidis* wykazała wrażliwość na wszystkie badane antybiotyki aminoglikozydowe. Uzyskane wyniki sugerują, że terapia skojarzona aminoglikozydów z ryfampicyną dałaby pożądaną efekt terapeutyczny w przypadku infekcji szczepami *S. epidermidis*.

Literatura

1. Büttner H., Mack D., Rohde H. *Structural basis of Staphylococcus epidermidis biofilm formation: mechanisms and molecular interactions*, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 17 (2015), doi:10.3389/fcimb.2015.00014
2. Deplano A., Vandendriessche S., Nonhoff C., Dodémont M., Roisin S., Denis O. *National surveillance of Staphylococcus epidermidis recovered from bloodstream infections in Belgian hospitals*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, (2016), doi:10.1093/jac/dkw086
3. von Eiff C., Peters G., Heilmann C. *Pathogenesis of infections due to coagulase negative staphylococci*, *The Lancet Infectious Diseases*, 2 (2002), s. 677-685
4. Piette A., Verschraegen G. *Role of coagulase-negative staphylococci in human disease*, *Veterinary Microbiology*, 134 (2009), s. 45-54
5. Becker K., Heilmann C., Peters G. *Coagulase-negative staphylococci*. *Clinical Microbiology Reviews*, 27 (2014), s. 870-926
6. Otto M. *Molecular basis of Staphylococcus epidermidis infections*, *Seminars in Immunopathology*, 34 (2012), s. 201-214
7. Malhotra A., Rayner J., Williams T.M., Prendergast B. *Infective Endocarditis: Therapeutic Options and Indications for Surgery*, *Current Cardiology Report*, 16 (2014), s. 464-450
8. Edson R.S., Terrell Ch.L. *The aminoglycosydes*, *Mayo Clinic Proceedings*, 74 (1999), s. 519-528
9. Różalska B., Sadowska B., Walencka E. *Wykrywanie biofilmów stanowiących problemy medyczne i perspektywy ich eradykacji*, *Zakażenia*, 1 (2010), s. 13-21
10. Wojtyczka R.D., Zięba A., Dziedzic A., Kępa M., Idzik D. *An activity of thioacyl derivatives of 4-aminoquinolinium salts towards biofilm producing and planktonic forms of coagulase-negative staphylococci*, *BioMed Research International*, 2015 (2015), s. 1-10. doi: 10.1155/2015/725939
11. Wojtyczka R.D., Orlewska K., Kępa M., Idzik D., Dziedzic A., Mularz T., Krawczyk M., Mikłasińska M., Wasik T.J. *Biofilm formation and antimicrobial susceptibility of staphylococcus epidermidis strains from a hospital environment*, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11 (2014), s. 4619-4633
12. Gerke C., Kraft A., Submuth R., Schweitzer O., Götz F. *Characterization of the N-acetylglucosaminyl transferase activity involved in the biosynthesis of*

- the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesion, *The Journal of Biological Chemistry*., 273 (1998), s. 18586-18593
13. Götz F. *Staphylococcus and biofilms*, *Molecular Microbiology*., 43 (2002), s. 1367-1378
 14. Vuong C., Kocianova S., Voyich J.M., Yao Y., Fischer E.R., DeLeo F.R., Otto M. *A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence*, *The Journal of Biological Chemistry*., 279 (2004), s. 54881-54886
 15. Fey P.D., Olson M.E. *Current concepts in biofilm formation of Staphylococcus epidermidis*, *Future Microbiology*., 5 (2010), s. 917-933
 16. Forrest G.N., Tamura K. *Rifampin Combination Therapy for Nonmycobacterial Infections*, *Clinical Microbiology Reviews*., 13 (2010), s. 14-34
 17. Reiter K.C., Sambrano G.E., Villa B., Paim T.G.S, de Oliveira C.F., d'Azevedo P.A. *Rifampicin fails to eradicate mature biofilm formed by methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, *Revista de Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*., 45 (2012), s. 471-474
 18. Christensen G.D., Simpson W.A., Bisno A.L., Beachey E.H. *Adherence of Slime-Producing Strains of Staphylococcus epidermidis to Smooth Surfaces*, *Infection and Immunity*., 37 (1982), s. 318-326
 19. Diamond - Hernandez B., Solórzano - Santos F., Leanos - Miranda B., Peregrino - Bejarano L., Miranda - Novales G. *Production of icaADBC-encoded polysaccharide intracellular adhesion and therapeutic failure in pediatric patients with staphylococcal device-related infections*, *BMC Infectious Diseases*., 10 (2010), s. 68-73
 20. Ziebuhr W., Heilmann F., Götz F., Meyer K. *Detection of the intracellular adhesion gene cluster (ica) and phase variation in Staphylococcus epidermidis blood culture strains and mucosal isolates*, *Infection and Immunity*., 65 (1997), s. 890-896
 21. Matuschek E., Brown D.F.J., Kahlmeter G. *Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories*, *Clinical Microbiology and Infection*., 20 (2014), s. 255-256
 22. Obeng-Nkrumah N., Appiah-Korang L., Acquah M.E., Donkor S.E. *Bloodstream infections in patients with malignancies: implications for antibiotic treatment in a Ghanaian tertiary setting*, *BMC Research Notes*., 8 (2015), s. 742, doi:10.1186/s13104-015-1701-z
 23. Maduka-Ezeh A.N., Greenwood-Quaintance K.E., Karau M.J., Barbari E.F., Osmon D.R., Hanssen A.D., Steckelberg J.M., Patel R. *Antimicrobial susceptibility and biofilm formation of Staphylococcus epidermidis small colony variants associated with prosthetic joint infection*, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*., 74 (2012), s. 224-229
 24. Sanfilippo C.M., Morrissey I., Janes R., Morris T.W. *Surveillance of the Activity of Aminoglycosides and Fluoroquinolones Against Ophthalmic Pathogens from Europe in 2010-2011*, *Current Eye Research*., 5 (2015), s. 581-589, doi:10.3109/02713683.2015.1045084

25. Blanco A.R., Roccaro A.S., Spoto C.G., Papa V. *Susceptibility of Methicillin-resistant Staphylococci Clinical Isolates to Netilmicin and Other Antibiotics Commonly Used in Ophthalmic Therapy*, Current Eye Research., 38 (2013), s. 811-816, doi:10.3109/02713683.2013.780624
26. Vergara-López S., Dominguez M.C., Conejo M.C., Pascual A., Rodriguez-Bano J. *Prolonged treatment with large doses of fosfomycin plus vancomycin and amikacin in a case of bacteremia due to methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis and IMP-8 metallo-β-lactamase-producing Klebsiella oxytoca*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy., (2015), doi:10.1093/jac/dku341
27. Nitsch-Osuch A., Choroszy-Król I., Kuchar E., Korzeniewski K., Życińska K., Wardyn K. *Microbiological Spectrum and Susceptibility Pattern of Clinical Isolates from the Neonatal Unit in a Single Medical Center*, Advances in Clinical and Experimental Medicine., 24 (2015), s. 15-22
28. Brzychczy-Włoch M., Borszewska-Kornacka M., Gulczynska E., Wojkowska-Mach J., Sulik M., Grzebyk M., Luchter M., Heczko P.B., Bulanda M. *Prevalence of antibiotic resistance in multi-drug resistant coagulase-negative staphylococci isolated from invasive infection in very low birth weight neonates in two Polish NICUs*, Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials., 12 (2013), s. 1-7, doi:10.1186/1476-0711-12-41
29. Guggenheim M., Zbinden R., Handschin A.E., Gohritz A., Altintas M.A., Giovanoli P. *Changes in bacterial isolates from burn wound and their antibiograms: A 20-year study(1986-2005)*, Burns., 35 (2009), s. 553-560.
30. Li C-R., Yang X-Y., Lou R-H., Zhang W-X., Wang Y-M., Yuan M., Li Y., Chen H-Z., Hong B., Sun Ch-H., Zhao L-X., Li Z-R., Jiang J-D., You X-F. *In Vitro Antibacterial Activity of Vertimicin and Its Susceptibility to Modifications by the Recombinant AAC(6')-APH(s'') Enzyme*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy., 52 (2008), s. 3875-3882.
31. Sahal G., Bilkay IS. *Multi drug resistance in strong biofilm forming clinical isolates of staphylococcus epidermidis*, Brazilian Journal of Microbiology., 45 (2014), s. 539-44.
32. Gomes F., Teixeira P., Ceri H., Oliveira R. *Evaluation of antimicrobial activity of certain combinations of antibiotics against in vitro Staphylococcus epidermidis biofilms*, Indian Journal of Medical Research., 135 (2012), s. 542-547.
33. Shah M.U., Akram M.F., Usman J., Kaleem F. *Incidence and Susceptibility Pattern of Methicillin Resistant Coagulase-Negative Staphylococci Isolated From a Tertiary Care Hospital of Pakistan*, Jundishapur Journal of Microbiology., 7 (2014), s. e8590, doi:10518/jjm.8590

Ocena wrażliwości na antybiotyki aminoglikozydowe i ryfampicyne szczepów *Staphylococcus epidermidis* tworzących i nietworzących biofilmu

Streszczenie

Staphylococcus epidermidis jest jednym z najbardziej powszechnych czynników etiologicznych zakażeń szpitalnych. Jego patogenność wiąże się ściśle ze zdolnością produkcji biofilmu. W obliczu wielolekooporności istnieje potrzeba wyszukania

niekonwencjonalnych środków terapeutycznych. Jednym z nich mogą być aminoglikozydy. Aminoglikozydy to grupa antybiotyków do której zaliczamy m.in. takie antybiotyki jak amikacynę, gentamycynę, netylmycynę oraz tobramycynę. Antybiotyki te stosowane są standardowo w terapii bakterii Gram-ujemnych. W naszej pracy przedstawiliśmy wpływ wyżej wymienionych antybiotyków na rozwój szczepów *Staphylococcus epidermidis* *in vitro* w zależności od fenotypowej zdolności tworzenia biofilmu. Badania polegały na identyfikacji szczepów *Staphylococcus epidermidis* pobranych z terenu województwa śląskiego i zbadaniu lekowrażliwości na wyżej wymienione antybiotyki aminoglikozydowe oraz ryfampicynę. Do identyfikacji biofilmu użyto metod molekularnych opartych o reakcję PCR oraz metod fenotypowych. Do badania lekowrażliwości użyto metody krążkowo-dyfuzyjnej zgodnie z wymaganiami EUCAST. Badane szczepy zostały podzielone na 2 grupy: tworzące biofilm (57,5%) oraz dla nietworzące biofilmu (42,5%). Oceniając lekowrażliwość szczepów *S. epidermidis* stwierdzono, że w przypadku amikacyny wynosiła 77,5% było wrażliwych, 12,5% szczepów średniowrażliwych oraz 10% szczepów opornych. W przypadku gentamycyny wrażliwość wykazywało 40% szczepów (60% szczepów opornych). Dla netylmycyny wrażliwość utrzymywała się na poziomie 77,5% (22,5% szczepów opornych). W przypadku tobramycyny zaobserwowano 65% szczepów wrażliwych (35% opornych). Oceniając lekowrażliwość na ryfampicynę w badaniach *in vitro* wykazano iż 97,5% *S. epidermidis* jest wrażliwych na ten antybiotyk. Podsumowując można stwierdzić że szczepy *S. epidermidis* wykazują wysoką oporność na antybiotyki aminoglikozydowe szczególnie tobramycynę i gentamycynę oraz bardzo wysoką wrażliwość na ryfampicynę. Jednocześnie w badaniach nie wykazano istotnych różnic w lekowrażliwości pomiędzy szczepami tworzącymi i nietworzącymi fenotypowo biofilmu. Co istotne w przeprowadzonych przez nas badaniach 35% szczepów *S. epidermidis* wykazało wrażliwość na wszystkie badane antybiotyki aminoglikozydowe.

Słowa kluczowe: aminoglikozydy, biofilm, lekowrażliwość, ryfampicyna, *S. epidermidis*

Antibacterial activity of aminoglycosides and rifampicin of *Staphylococcus epidermidis* strains forming and non-forming biofilm

Abstract

Staphylococcus epidermidis is one of the most common etiological factor of nosocomial infections. Its pathogenicity is correlated with the ability to form biofilm. We analyzed the drug resistance pattern towards aminoglycosides and rifampicin among *S. epidermidis* strains with and without biofilm forming abilities. These antibiotics are commonly used for Gram negative infections but also in a therapy of endocarditis. In our study we tested *S. epidermidis* strains isolated from clinical samples collected in hospitals of Silesia province, Poland. In our research we applied two methods of identifying biofilm formation capability. One was based on molecular approach with the standard PCR reaction, and to find phenotypic ability we applied modified Christiansen method. The EUCAST standards were observed while the antibiotics resistance profiles were determined. Among all analyzed *S. epidermidis* strains 57,5% showed biofilm forming abilities. Seventy seven point five percent strains were sensitive to amikacin, 12,5% semi-sensitive and 10% were resistant while 40% strains were sensitive to gentamicin (60% were resistant). In the case of netilmicin 77,5% strains were sensitive (22,5% were resistant) and for tobramycin 65% strains were sensitive (35% were resistant). Among all *S. epidermidis* isolates 97,5% were sensitive to rifampicin. Our results showed high resistance for aminoglycoside of *Staphylococcus epidermidis* strains especially for gentamicin and tobramycin. The most effective was rifampicin. What is essential, 35% of strains showed sensitivity to all antibiotics. No difference in the resistance pattern was observed among biofilm forming and not forming *S. epidermidis* strains.

Key words: aminoglycosides, biofilm, drug susceptibility, rifampicin, *S. epidermidis*

Podejście populacyjne do modelowania farmakokinetyki leków

1. Wstęp

Farmakokinetyka opisuje zmiany, którym podlega lek w organizmie wraz z upływem czasu po podaniu dawki. Do opisu zmian stężeń leku stosuje się empiryczne modele matematyczne, które mogą być następnie wykorzystywane do przewidywania profilu zależności stężenia od czasu po podaniu innych dawek leku [1].

W tradycyjnym ujęciu analiza farmakokinetyczna opiera się na zbudowaniu modelu matematycznego opartego na obserwacjach uzyskanych od indywidualnego pacjenta. Niestety, opieranie się na tych parametrach w celu przewidywania stężeń u kolejnego pacjenta kończy się najczęściej niepowodzeniem. Wynika to z różnic międzysobniczych występujących w populacji – pacjenci różnią się od siebie pod względem płci, wieku, stanu zdrowia, przyjmowanych leków czy metabolizmu. Im bardziej kolejny pacjent różni się od pacjenta, dla którego zostały oszacowane parametry, tym większy błąd popełniany w przewidywaniach na podstawie tych parametrów. W praktyce klinicznej pacjenci, dla których dobiera się dawki, to osoby chore, o zaburzonej fizjologii, u których istnieje bardzo duże prawdopodobieństwo odchylenia od wartości przewidywanych. Podejście populacyjne do modelowania farmakokinetyki leku uwzględnia zmienność parametrów farmakokinetycznych i umożliwia włączenie do modelu kowariant wyjaśniających część zmienności [1].

Dawkowanie leku można dobierać na podstawie parametrów farmakokinetycznych, które podawane są przez producentów na podstawie badań klinicznych przeprowadzanych w procesie rejestracji leku. Parametry te mogą jednak znacznie odbiegać od wartości parametrów dla pacjentów leczonych danym lekiem w rzeczywistej sytuacji klinicznej, ponieważ badania te przeprowadzane są na homogenicznej, starannie dobranej grupie pacjentów. Zakres zmienności parametrów farmakokinetycznych

¹ agnieszka@gumed.edu.pl, Katedra Biofarmacji i Farmakodynamiki, Wydział Farmaceutyczny, Gdański Uniwersytet Medyczny, www.gumed.edu.pl

² wiczling@gumed.edu.pl, Katedra Biofarmacji i Farmakodynamiki, Wydział Farmaceutyczny, Gdański Uniwersytet Medyczny, www.gumed.edu.pl

w docelowej populacji pacjentów jest znacznie większy niż zmienność zaobserwowana podczas takiego badania klinicznego. Celem modelowania populacyjnego jest badanie pacjentów w rzeczywistej sytuacji klinicznej, w odróżnieniu do zdrowych ochotników lub pacjentów starannie wyselekcjonowanych, którzy włączani są do sponzorowanego badania klinicznego [2].

Podsumowując, farmakokinetykę populacyjną można zdefiniować jako naukę o źródłach zmienności stężeń leku i ich wzajemnych zależnościach w grupie pacjentów, która jest populacją docelową otrzymującą badany lek [3]. Celem modelowania populacyjnego jest oszacowanie typowych parametrów farmakokinetycznych oraz poszukiwanie źródeł ich zmienności w populacji. Modele populacyjne mogą mieć charakter opisowy, wówczas ich głównym celem jest opis i zrozumienie dostępnych danych. Natomiast modele o charakterze predykcyjnym, zbudowane na podstawie modeli opisowych, są wykorzystywane do symulacji nowych sytuacji klinicznych poprzez interpolację lub ekstrapolację. Interpolacja stosowana jest do przewidywań w zakresie warunków, dla których model był zbudowany (np. przewidywania dla dawki 150 mg przy pomocy modelu zbudowanego dla dawek od 100 do 200 mg), natomiast ekstrapolacja generuje przewidywania poza tym zakresem. Modele predykcyjne pozwalają na świadomą ocenę nowych schematów leczenia przed ich zastosowaniem w praktyce klinicznej [4, 5]. Amerykańska Agencja Żywności i Leków (ang. Food and Drug Administration, FDA) kładzie obecnie duży nacisk na to, aby nowe badania klinicznie były projektowane w oparciu o symulacje na podstawie modeli farmakokinetycznych, co pozwoli zwiększyć zarówno odsetek badań klinicznych zakończonych sukcesem, jak i informatywność otrzymanych wyników [6].

2. Elementy populacyjnego modelu farmakokinetycznego

Model strukturalny stosowany dla każdego pacjenta osobno opisuje jedynie kształt zależności stężenia od czasu, bez informacji o jakiegokolwiek zmienności. Parametry uzyskane z modelu są prawdziwe tylko dla pacjenta, dla którego zostały wyznaczone. Model strukturalny można przedstawić jako:

$$Y_j = f(\theta, x_j) \quad (1)$$

gdzie Y_j to j -ta obserwacja zmiennej zależnej Y , $f(\theta, x_j)$ to funkcja opisująca wartość oczekiwaną zmiennej Y w funkcji zmiennej niezależnej x dla wartości parametrów θ , θ to wektor parametrów definiujących zależność pomiędzy x i Y u danego pacjenta [1].

Obserwacje zmiennej zależnej zawsze obarczone są błędem. Wymaga to uwzględnienia w modelu dodatkowego członu ε , opisującego szum

pomiarowy, niedopasowanie modelu czy inne losowe czynniki zakłócające. Wówczas jest to model dla indywidualnego pacjenta, a dane można opisać zależnością:

$$Y_j = f(\theta, x_j) + \varepsilon_j \quad (2)$$

gdzie ε_j to błąd resztkowy. Najczęściej zakłada się, że wartości błędów mają rozkład normalny o średniej 0 i wariancji σ^2 . Wariancja błędów może być modelowana jako wartość stała lub zmieniająca się w zależności od wielkości pomiaru. Odchylenie standardowe dla ε oznaczane jest symbolem σ . Wariancja σ^2 jest estymowanym parametrem modelu [1,7,8].

Poprzez dodanie informacji na temat rozkładu wartości parametrów modelu strukturalnego θ u badanych pacjentów, otrzymujemy model populacyjny:

$$Y_{i,j} = f((\theta + \eta_i), x_{i,j}) + \varepsilon_{i,j} \quad (3)$$

gdzie $Y_{i,j}$ to j-ta obserwacja zmiennej zależnej Y u i-tego pacjenta, $f((\theta + \eta_i), x_{i,j})$ to funkcja opisująca wartość oczekiwaną zmiennej Y dla j-tej wartości zmiennej x u i-tego pacjenta z wektorem parametrów strukturalnych θ o zmienności η_i , θ to wektor parametrów definiujących zależność pomiędzy x i Y dla typowego pacjenta w populacji, η_i to wektor zmienności międzyosobniczej dla θ , a $\varepsilon_{i,j}$ to błąd resztkowy dla j-tej obserwacji u i-tego pacjenta.

Badana populacja opisana jest jedną wartością każdego z parametrów strukturalnych modelu, zebranych w wektorze θ . Wartości parametrów dla indywidualnych pacjentów można otrzymać poprzez modyfikację parametrów populacyjnych o wartości zmienności η_i , które szacowane są dla każdego pacjenta i każdego parametru, a w populacji mają rozkład normalny o wartości średniej równej 0. Wariancja dla η oznaczana jest jako ω^2 , a odchylenie standardowe ω . Wartości ω^2 są estymowanymi parametrami modelu. Dla i-tego pacjenta ε_{ij} jest zmienną losową o dystrybucji normalnej ze średnią 0 [1].

Model populacyjny można zatem zdefiniować przy użyciu 3 rodzajów parametrów. Parametry θ są stałe w populacji i są traktowane jako parametry strukturalne dla typowego pacjenta. Przy ich pomocy modeluje się zmienność, którą można wyjaśnić przy pomocy dodatkowych zmiennych objaśniających. Zmienne η , których wariancja jest parametrem w modelu, mają unikalne wartości dla każdego pacjenta, w populacji mają średnią 0 i rozkład normalny. Używane są do opisu losowej zmienności parametrów strukturalnych pomiędzy pacjentami w populacji. Zmienne ε , dla których w modelu estymowana jest wariancja, mają nową wartość dla każdej obserwacji, średnią 0 w populacji i rozkład normalny. Wartości parametrów η nie muszą być szacowane dla każdego parametru θ [1].

3. Statystyczne metody stosowane do estymacji parametrów populacyjnych

3.1. Data pooling (ang. *naïve pooled data*)

Jest to podejście bardzo uproszczone, które skupia się całkowicie na oszacowaniu parametrów strukturalnych modelu z pominięciem zmienności międzyosobniczej. Dane uzyskane z populacji przebadanych pacjentów traktowane są tak, jakby pochodziły od jednego pacjenta. Model dopasowuje się zwykle przy pomocy metody najmniejszych kwadratów.

Jeśli ilość próbek od każdego pacjenta jest podobna, a populacja zbalansowana, metoda pozwala oszacować parametry populacyjne zbliżone do parametrów uzyskanych bardziej zaawansowanymi metodami. Parametry te można zastosować następnie jako wartości wyjściowe dla algorytmów iteracyjnych w bardziej złożonych metodach populacyjnych.

Jest to jednak podejście niedoskonałe pod wieloma względami, gdyż ignoruje oba źródła zmienności w zaobserwowanych stężeniach. Założenia tej metody wykluczają możliwość otrzymania parametrów dla indywidualnych pacjentów. Błędy standardowe dla parametrów mogą zostać oszacowane, natomiast niemożliwa jest estymacja zmienności między pacjentami. Dodatkowo zmienność międzyosobnicza może zaburzać rzeczywisty kształt zależności stężenia od czasu, co często powoduje dopasowanie bardziej skomplikowanego modelu strukturalnego niż rzeczywisty model, który zostałby dopasowany dla każdego pacjenta osobno [1].

Podjęcie to jest zadowalające przy niewielkiej zmienności międzyosobniczej i dużej liczbie próbek, jednak w przypadkach, w których założenia te nie są spełnione, może prowadzić do błędnych wyników. Stosowanie tej metody nie jest zalecane w badaniach klinicznych.

3.2. Metoda dwuetapowa (ang. *two-stage method*)

W tradycyjnym ujęciu analiza farmakokinetyczna opiera się na szacowaniu parametrów modelu strukturalnego kolejno dla każdego pacjenta. Dopasowanie modelu kompartmentowego do danych farmakokinetycznych dla każdego pacjenta jest możliwe, gdy dostępna jest wystarczająca ilość próbek od każdej osoby. Zwykle takie dane uzyskuje się w pierwszej fazie badań klinicznych. Dopasowanie parametrów do danych generuje zestaw unikalnych wartości parametrów farmakokinetycznych dla każdego pacjenta. Otrzymane parametry można w prosty sposób podsumować przy pomocy statystyk opisowych, najczęściej średniej arytmetycznej i odchylenia standardowego. Średnia arytmetyczna jest statystyką przydatną do opisu rozkładów symetrycznych, jednak rozkład większości parametrów farmakokinetycznych jest skośny. Wynika

to z faktu, że ich wartość nie może spaść poniżej zera, dlatego opisywane są rozkładem log-normalnym. W związku z tym lepszym estymatorem parametrów typowych w populacji jest średnia geometryczna, która jest eksponentą średniej arytmetycznej ze zlogarytmowanych wartości parametrów [1, 8].

Podejście to nazywane jest metodą dwuetapową, ponieważ w pierwszym etapie szacowane są parametry farmakokinetyczne dla każdego pacjenta osobno. W drugim etapie parametry indywidualnych pacjentów są podsumowywane przy pomocy statystyk opisowych, których wartości traktowane są jako populacyjne wartości parametrów farmakokinetycznych [8].

Zakłada się, że średnie wartości parametrów strukturalnych otrzymane tą metodą są nieobciążone przy bardzo dużej populacji. Problem pojawia się przy szacowaniu wariancji w populacji, ponieważ na etapie podsumowania parametrów farmakokinetycznych oszacowanych indywidualnie dla każdego pacjenta, parametry traktowane są jako precyzyjnie zmierzone zmienne. Tymczasem każdy indywidualny parametr farmakokinetyczny jest obciążony, ponieważ nie jest pomiarem, ale wartością oszacowaną na podstawie pomiarów [1, 8].

Stężenie leku w płynach ustrojowych oznaczane jest ze zdefiniowaną precyzją. Stężenia te są opisywane przy pomocy parametrów farmakokinetycznych, które są szacowane również z określoną precyzją. Estymowane parametry farmakokinetyczne stają się następnie zmiennymi, które charakteryzowane są przy pomocy statystyk opisowych. Precyzja oszacowania indywidualnych parametrów modelu strukturalnego może być znacząco różna dla każdego pacjenta. Przy pomocy metody dwuetapowej nie można rozróżnić precyzji oszacowania parametrów dla poszczególnych pacjentów. Błąd oszacowania średniej i odchylenia standardowego parametrów farmakokinetycznych jest potęgowany przez błąd już obecny, którego źródłem są estymacje parametrów strukturalnych dla każdego pacjenta. Te dwa źródła błędów nie mogą być rozróżnione, dlatego są interpretowane jako zmienność międzypersonalna. Podsumowując, w metodzie dwuetapowej błąd oszacowania parametrów indywidualnych nie można oddzielić od zmienności parametrów indywidualnych w populacji [1].

Związek pomiędzy błędem pomiarowym a zmiennością międzypersonalną nie jest całkowicie intuicyjny. Dodatkowo komplikuje go jeszcze nieliniowa zależność między stężeniami leku a parametrami [7]. Problem ten można zobrazować w praktyce przy pomocy prostej symulacji. Symulacja oparta będzie na pojedynczym podaniu dożylnym przykładowego leku, którego farmakokinetykę opisuje model jednokompartamentowy. W modelu uwzględniony zostanie błąd resztkowy oraz zmienność międzypersonalna dla klirensu. Jeśli w modelu uwzględniony jest tylko błąd resztkowy (Rys. 1A), zmienność stężeń wynika ze

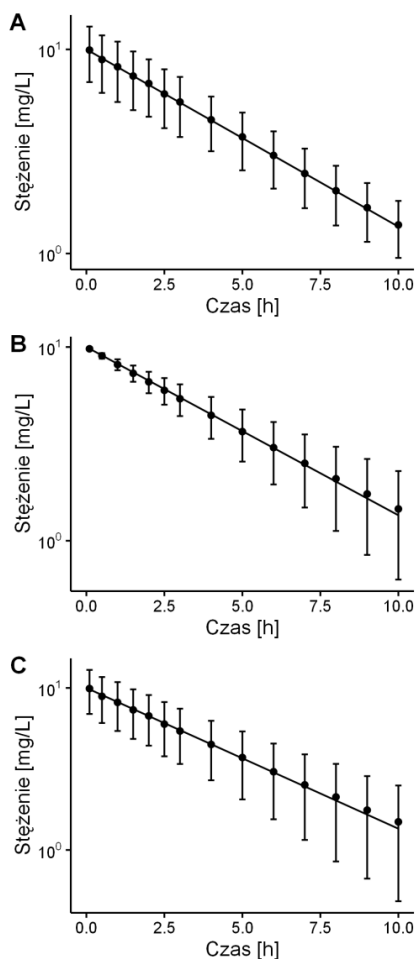
zmienności analitycznej podczas oznaczania stężeń u tego samego pacjenta. Zastosowanie modelu proporcjonalnego powoduje, że zmienność obserwacji jest proporcjonalna do wartości stężenia przewidzianego przez model. Średnie wartości symulowanych stężeń (punkty) leżą na linii reprezentującej stężenia uzyskane z typowych wartości parametrów farmakokinetycznych w populacji. Jeśli znane są rzeczywiste wartości stężeń, a zmienność wynika tylko z różnic w wartości parametru farmakokinetycznego (w tym przypadku – klirensu) w populacji, zmienność stężeń zaobserwowana w symulacji wynika z przebadania różnych pacjentów (Rys. 1B). W odróżnieniu od poprzedniej sytuacji, współczynnik zmienności (ang. *coefficient of variation*, CV) stężeń zmienia się w czasie, a średnie wartości stężeń odstają od stężeń przewidzianych przez typowe wartości parametrów farmakokinetycznych w populacji. Wynika to z nieliniowej zależności pomiędzy parametrami eliminacji i dystrybucji a czasem. W rzeczywistej sytuacji klinicznej mamy do czynienia z połączeniem obu źródeł zmienności (Rys. 1C).

Tabela 1 ilustruje wpływ źródeł zmienności na wartości stężeń przewidzianych przez model w wybranych punktach czasowych. Porównując współczynniki zmienności wynikające z uwzględnienia w modelu tylko zmienności dla reszt (Rys. 1A) lub tylko zmienności międzyosobniczej (Rys. 1B) ze współczynnikiem zmienności przy uwzględnieniu obu zmienności (Rys. 1C), można zauważyć, że CV stężeń dla połączonych źródeł zmienności nie jest prostą sumą CV dla zmienności resztkowej i międzyosobniczej. Dodatkowo, CV stężeń przy uwzględnieniu zmienności międzyosobniczej zmienia się w czasie, stąd ilość informacji o zmienności w populacji zależna jest od czasu, w którym została pobrana próbka.

Tabela 1. Zmienność stężeń w wybranych punktach czasowych po podaniu dawki leku (dawka 100 mg, model jednokompartementowy, klirens = 2 L/h, objętość dystrybucji = 10 L), każdy wiersz uzyskano na podstawie 1000 symulacji przy użyciu modelu z uwzględnieniem zmienności resztkowej (błąd proporcjonalny ze stałym współczynnikiem zmienności 30%), międzyosobniczej (klirens opisany rozkładem log-normalnym z wariancją równą 0.1) i obu zmienności na raz

| Źródło zmienności | Współczynnik zmienności (%) dla stężeń w wybranych punktach czasowych | | |
|--|--|-----|------|
| | 6 min | 4 h | 10 h |
| Zmienność resztkowa | 30 | 30 | 30 |
| Zmienność międzyosobnicza | 1 | 24 | 57 |
| Zmienność resztkowa i międzyosobnicza | 30 | 40 | 68 |

Źródło: opracowanie własne



Rysunek 1. Stężenia uzyskane z 1000 symulacji: linia ciągła to zależność stężenia od czasu po jednokrotnym 100 mg dla średnich wartości parametrów farmakokinetycznych: klirens - 2 L/h, objętość dystrybucji – 10 L, punkty to średnie stężenie w danym punkcie czasowym wraz z odchyleniem standardowym wynikającym z uwzględnienia w modelu: A – zmienności resztkowej o stałym współczynniku zmienności 30%, B – zmienności międzypersonicznej dla klirensu, opisanego rozkładem log-normalnym o wariancji 0.1, C – obu źródeł zmienności jednocześnie [opracowanie własne]

3.3. Nieliniowe modelowanie efektów mieszanych

Nieliniowe modelowanie efektów mieszanych (NLMEM) jest obecnie synonimem analizy populacyjnej. Nieliniowość odnosi się do tego, że zmienna zależna (w tym wypadku – stężenie leku) jest powiązana nieliniowo z parametrami modelu i zmienną niezależną. Efekty mieszane

odnoszą się do parametryzacji modelu: parametry, które nie zmieniają się pomiędzy pacjentami to efekty stałe (ang. *fixed effects*), natomiast parametry zmieniające się pomiędzy pacjentami to efekty losowe (ang. *random effects*) [4]. Oba typy parametrów są reprezentowane przez pojedynczą wartość: dla parametrów stałych jest to typowa wartość parametru w populacji, natomiast dla parametrów losowych jest to wartość wariancji opisującej dystrybucję [5].

Procedura nieliniowego modelowania efektów mieszanych została wprowadzona przez Sheinera i Beala w 1979 roku. Anglojęzyczny skrót NONMEM (ang. *nonlinear mixed effects modeling*) używany jest w odniesieniu zarówno do samej metody, jak i do najpopularniejszego programu do analizy populacyjnej. Dane pochodzące od wszystkich pacjentów są analizowane jednocześnie, z zachowaniem rozróżnienia poszczególnych pacjentów. Indywidualne profile zależności stężenia od czasu są z założenia zbliżone do profilu populacyjnego [1].

Podstawową zaletą NLMEM jest to, że w przeciwieństwie do wcześniej opisywanych metod, nie wymaga wielu pomiarów od każdego pacjenta. Umożliwia to badanie populacji docelowej podczas rutynowej hospitalizacji, w czasie której nie zawsze można pobrać wiele próbek od pacjenta. Dodatkowo NLMEM nie wymaga pobierania próbek według sztywnego schematu [4]. W połączeniu z empirycznym wnioskowaniem bayesowskim NLMEM oszacowuje też parametry dla poszczególnych pacjentów. Kolejną zaletą jest estymacja pełnej macierzy wariancji-kowariancji dla parametrów, dzięki czemu znana jest precyzja oszacowania parametrów. Umożliwia to ocenę rzeczywistej zmienności każdego parametru strukturalnego, niezakłóconej zmiennością resztkową [1].

Procedura tworzenia modelu populacyjnego obejmuje zbudowanie modelu strukturalnego, modelu statystycznego oraz modelu kowariancji [4].

3.3.1. Model strukturalny

Do opisu danych farmakokinetycznych najszerzej stosowane są modele kompartmentowe. Na wykresie zależności stężenia leku od czasu po pojedynczym podaniu można zwykle zauważyć jedną, dwie lub trzy fazy wykładnicze, które można opisać przy pomocy modelu jedno-, dwu- lub trójkompartmentowego. Po zlogarytmowaniu stężenia, na wykresie dzień.-tyfikować można odrębne fazy liniowe o różnym nachyleniu, z których każda wymaga opisu osobnym kompartmentem. W szczególnych przypadkach logarytm stężenia nie będzie wykazywał liniowej zależności od czasu, co może być spowodowane podobnymi okresami półtrwania dla kompartmentów lub nieliniowością farmakokinetyki [4]. Modele kompartmentowe opisywane są przy pomocy równań różniczkowych lub ich analitycznych rozwiązań.

3.3.2. Model statystyczny

Model statystyczny opisuje zmienność wokół modelu strukturalnego. W każdym populacyjnym modelu farmakokinetycznym obecne są dwa główne źródła zmienności: zmienność międzyosobnicza oraz zmienność resztkowa. W przypadku kilkukrotnego podania leku w znaczących odstępach czasu, podczas których jego farmakokinetyka może ulec zmianie, w modelu można uwzględnić również zmienność między podaniami. Dobranie odpowiedniego modelu statystycznego jest kluczowym etapem budowania modelu populacyjnego, gdyż umożliwia rzeczywistą ocenę wpływu kowariant na parametry farmakokinetyczne, a także późniejsze wykorzystanie modelu do prawidłowej symulacji nowych sytuacji klinicznych [4].

3.3.2.1. Model dla zmienności międzyosobniczej

Parametry farmakokinetyczne nie mają jednej stałej wartości w populacji – u każdego pacjenta przyjmują one inne wartości. W obrębie populacji można opisać zmienność wybranych parametrów. Dane farmakokinetyczne są często modelowane przy założeniu log-normalnego rozkładu parametrów strukturalnych w populacji, ponieważ parametry modelu strukturalnego muszą mieć wartości dodatnie i często wykazują prawoskośność. Klirens dla i -tego pacjenta jest wówczas przedstawiony w postaci:

$$CL_i = \theta \cdot \exp(\eta_i) \quad (4)$$

gdzie θ jest wartością populacyjną klirensu, a η_i jest odchyleniem od wartości populacyjnej klirensu dla i -tego pacjenta. Dzięki takiemu przekształceniu rozkład indywidualnych wartości klirensu jest log-normalny, ale rozkład wartości η_i jest normalny [4].

Parametry opisujące zmienność parametrów strukturalnych zebrane są w osobnych wektorach $\eta_{n,i}$ dla każdego pacjenta i , gdzie n to indeks dla elementu wektora efektów losowych. Parametrem losowym szacowanym w procesie dopasowywania modelu jest wariancja rozkładu wartości $\eta_{n,i}$ (zmienności międzyosobniczej dla n -tego parametru efektów stałych w badanej populacji) – ω_n^2 . W NLMEM wariancja parametrów η jest szacowana w postaci macierzy wariancji-kowariancji Ω . W modelu opisanym przy pomocy poniższych efektów stałych i losowych:

$$CL_i = \theta_1 \cdot \exp(\eta_{1,i}) \quad (5)$$

$$V_i = \theta_2 \cdot \exp(\eta_{2,i}) \quad (6)$$

gdzie CL_i i V_i to odpowiednio wartości klirensu i objętości dystrybucji dla i -tego pacjenta, θ_1 i θ_2 to wartości średnie w populacji dla tych

parametrów, a $\eta_{1,i}$ i $\eta_{2,i}$ to wartości zmienności międzyosobniczej dla klirensu i objętości dystrybucji u i-tego pacjenta [5].

Dla pacjenta o indeksie 1 wektor zmienności międzyosobniczej składa się z oszacowanych wartości $\eta_{1,1}$ oraz $\eta_{2,1}$. Dla każdego kolejnego pacjenta szacowane są unikalne wartości tych efektów losowych. Rozkład wartości $\eta_{1,i}$ w populacji jest opisany wariancją, która jest elementem macierzy Ω leżącym na głównej przekątnej macierzy w pierwszym wierszu i pierwszej kolumnie ($\omega_{1,1}^2$). Analogicznie, rozkład wartości $\eta_{2,i}$ opisany jest wariancją, która jest elementem macierzy znajdującym się w drugim wierszu i drugiej kolumnie ($\omega_{2,2}^2$). Macierz Ω dla tego przykładu jest macierzą diagonalną, przedstawioną poniżej w postaci dolnej macierzy trójkątnej:

$$\Omega = \begin{bmatrix} \omega_{1,1}^2 & \\ 0 & \omega_{2,2}^2 \end{bmatrix} \quad (7)$$

gdzie $\omega_{1,1}^2$ jest wariancją rozkładu stałej szybkości eliminacji, a $\omega_{2,2}^2$ wariancją rozkładu objętości dystrybucji w badanej populacji. Elementy leżące poza główną przekątną reprezentują kowariancję pomiędzy dwoma parametrami, stąd element $\omega_{2,1}^2$ jest kowariancją pomiędzy stałą szybkości eliminacji a objętością dystrybucji. Wartości elementów poza główną diagonalą przyjmuje się za równe 0, za wyjątkiem przypadków, w których kowariancja jest bezpośrednio uwzględniona w modelu [5].

Dla rozkładu indywidualnych wartości parametrów η niezbędna jest ocena skośności i kurtozy. Skośność określa asymetrię rozkładu spowodowaną wydłużeniem jednego z ogonów rozkładu, natomiast kurtoza jest miarą spłaszczenia rozkładu. Rozkłady silnie skośne lub kurtyczne mogą zwiększać ryzyko popełnienia błędu I i II rodzaju w procesie poszukiwania istotnych kowariant [4].

NLMEM w pierwszym etapie oszacowuje wartości populacyjne parametrów, natomiast indywidualne wartości parametrów są szacowane przy pomocy innej funkcji celu w drugim etapie, zwanym empirycznym etapem bayesowskim, etapem *post hoc* lub etapem warunkowym. Funkcja celu estymuje najlepsze wartości parametrów modelu dla każdego pacjenta w populacji poprzez ważenie odchylenia indywidualnych stężeń przewidzianych przez model w odniesieniu do rzeczywistych pomiarów oraz odchylenia indywidualnych wartości parametrów w odniesieniu do wartości populacyjnych. Dla pacjentów, dla których zebrano małą ilość pomiarów, indywidualne wartości parametrów "zbiegają się" do wartości parametrów populacyjnych. Jeśli zjawisko to jest silnie zaznaczone, graficzne przedstawienie zależności indywidualnych parametrów od kowariant może zaburzać rzeczywisty kształt zależności, ukryć zależność lub sugerować zależność nieistniejącą. W takim przypadku ocena modelu powinna skupić się na wartości funkcji celu oraz przewidywaniach populacyjnych [4].

3.3.2.2. Model dla zmienności resztkowej (model dla reszt)

Zmienność resztkowa opisuje niewyjaśnione różnice pomiędzy wartościami zmiennej zależnej przewidzianymi przez model a wartościami rzeczywistych pomiarów zmiennej zależnej. Zmienność resztkowa pochodzi z różnych źródeł, takich jak niepewność pomiarowa, błędy podczas pobierania próbek czy niedopasowanie modelu. Jeśli za zmienną zależną przyjmiemy stężenie leku w osoczu C w czasie t , wówczas dla j -tego pomiaru u i -tego pacjenta model dla zmienności resztkowej możemy zapisać w postaci:

$$C(t)_{i,j} = \widehat{C}(t)_{i,j} + \varepsilon_{i,j} \quad (8)$$

gdzie $\widehat{C}(t)_{i,j}$ to wartość stężenia przewidziana przez model. Rozkład różnic pomiędzy stężeniami zaobserwowanymi a przewidzianymi przez model, ε , jest opisywany wariancją σ^2 . W odróżnieniu od parametrów η , które przyjmują unikalną wartość dla każdego pacjenta, parametry ε przyjmują unikalne wartości dla każdego pomiaru [5].

Powyższy model uwzględniający zmienność resztkową zakłada addytywność błędu i jego niezależność od czasu i parametrów modelu. Model ten zakłada, że zmienność resztkowa jest stała. Parametry modelu mogą być szacowane przy pomocy dwóch podstawowych metod: metody najmniejszych kwadratów (MNK) oraz metody największej wiarygodności (MNW). W przypadku, gdy rzeczywiście $\varepsilon \sim N(0, \sigma^2)$, wartości parametrów oszacowanych przy pomocy obu metod są zgodne [8]. Jednakże model addytywny w kontekście opisu farmakokinetyki leku jest często nieodpowiedni i może prowadzić do błędnych lub pozbawionych sensu wyników. Gdy podczas modelowania stężeń leku oszacowany błąd resztkowy jest duży i ma wartości ujemne, wówczas dopuszcza on ujemne wartości stężeń, które *de facto* nie istnieją. W tym przypadku bardziej odpowiednim modelem dla błędu resztkowego byłby model wymuszający dodatnie wartości stężeń [8]. Model addytywny może być zastosowany, gdy skrajne wartości stężeń różnią się od siebie nie więcej niż o jeden rząd wielkości. W praktyce podczas modelowania farmakokinetyki sytuacja taka ma miejsce głównie przy oznaczaniu stężeń w stanie stacjonarnym po podaniu wielokrotnym lub podczas wlewu ze stałą szybkością [5]. Jeśli jednak stężenia leku w czasie przyjmują wartości różniące się od siebie o kilka rzędów wielkości, błąd resztkowy będzie miał większą wartość bezwzględną przy większych wartościach stężeń. Jeśli chcemy, aby każdy pomiar wnosił równorzędną ilość informacji do oszacowania parametrów, musimy wziąć pod uwagę przewidywaną wartość błędu w odniesieniu do przewidywanej wartości stężenia [1]. W takim przypadku zastosowanie ma model zmienności resztkowej o stałym współczynniku zmienności (ang.

constant coefficient of variation, CCV), inaczej zwany modelem proporcjonalnym. W modelu proporcjonalnym wielkość błędu resztkowego jest proporcjonalna do wartości stężenia przewidzianego przez model w danym punkcie czasowym, co można zapisać:

$$C(t)_{i,j} = \widehat{C}(t)_{i,j} + \widehat{C}(t)_{i,j} \cdot \varepsilon_{i,j} \quad (9)$$

Przy mniejszych wartościach stężeń przewidzianych przez model wariancja błędu jest relatywnie niewielka, natomiast przy wartościach większych wariancja ta jest stosunkowo większa.

Dla danych farmakokinetycznych o dużej ilości pomiarów najczęściej stosuje się połączony model addytywny i proporcjonalny [4]. Komponent addytywny przeważa, gdy stężenia przewidziane przez model są niskie, natomiast udział komponentu proporcjonalnego rośnie wraz ze wzrostem stężeń przewidzianych przez model. Taki model dla błędu resztkowego można przedstawić przy pomocy dwóch zmiennych losowych:

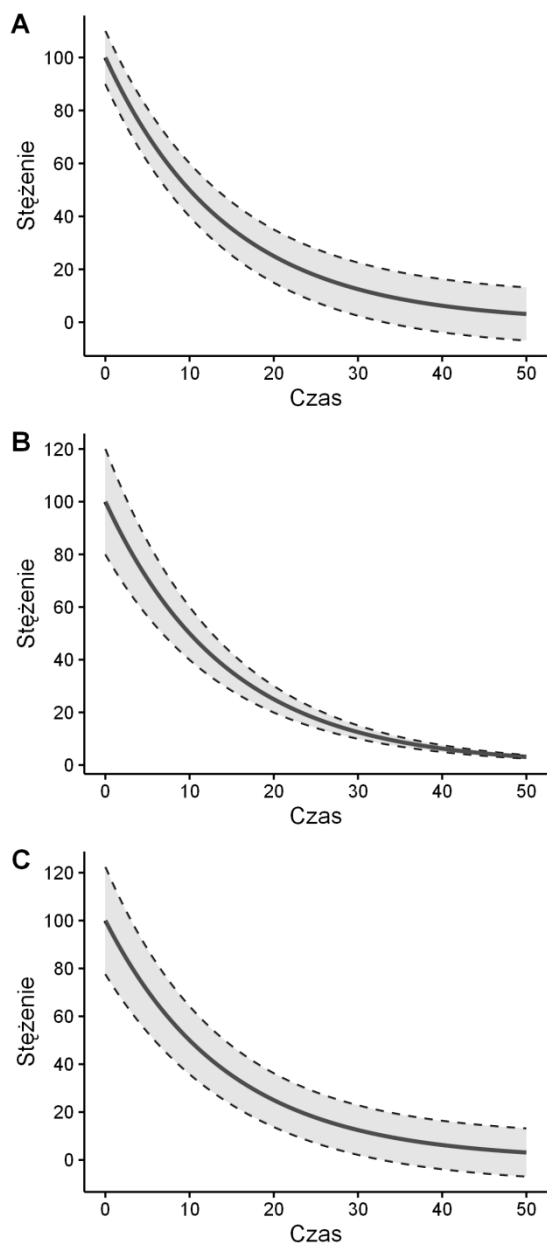
$$C(t)_{i,j} = \widehat{C}(t)_{i,j} + \widehat{C}(t)_{i,j} \cdot \varepsilon_{prop,i,j} + \varepsilon_{add,i,j} \quad (10)$$

gdzie ε_{add} jest zmienną losową opisującą część addytywną zmienności resztkowej, a ε_{prop} jest zmienną losową opisującą część proporcjonalną zmienności resztkowej. Całkowity współczynnik zmienności oblicza się przy pomocy wyrażenia:

$$CV = \frac{\sqrt{(\widehat{C}(t))^2 \cdot \sigma_{prop}^2 + \sigma_{add}^2}}{\widehat{C}(t)} \quad (11)$$

Kształty omówionych modeli dla błędu resztkowego zostały przedstawione schematycznie na Rysunku 2.

Wybór odpowiedniego modelu zależy od rodzaju danych, które są przedmiotem analizy. Ocena doboru modelu dla zmienności resztkowej jest standardowym elementem procesu budowania modelu populacyjnego. Odpowiedni opis zmienności resztkowej jest niezbędny do tego, aby oddzielić zmienność przypadkową od rzeczywistej zmienności międzyosobniczej. Warto także pamiętać o tym, że sposób zakodowania zmienności resztkowej ma wpływ na wartości parametrów strukturalnych populacyjnego modelu farmakokinetycznego [4, 5].



Rysunek 2. Zależność stężenia od czasu po pojedynczym podaniu dożylnym dla leku o farmakokinetyce opisanej strukturalnym modelem jednokompartmentowym (linia ciągła) z modelem dla błędów resztkowych: A – model addytywny, B – model proporcjonalny, C – połączony model addytywny i proporcjonalny dla błędów resztkowych [opracowanie własne]

3.3.3. Model kowariancji

Identyfikacja istotnych kowariant pozwala na wyjaśnienie części zmienności dla istotnych klinicznie parametrów farmakokinetycznych. Potencjalne kowarianty wybiera się na podstawie dostępnej wiedzy o leku, np. dla silnie metabolizowanych leków model powinien uwzględniać zmienne towarzyszące takie jak masa ciała, aktywność enzymatyczna czy genotyp. Podstawową metodą poszukiwania zależności między parametrami a kowariantami jest ich graficzna ocena. Wyraźny trend zauważalny na wykresie powinien zniknąć po dodaniu zmiennej towarzyszącej do modelu. Wybór istotnych kowariant, które powinny zostać uwzględnione w modelu opiera się zwykle na teście ilorazu wiarygodności dla modeli zagnieżdżonych [4].

Kowarianty mogą być zmiennymi ciągłymi, jak i dyskretnymi, co wymaga zastosowania różnych strategii implementacji w modelu. Nadrzędnym celem jest jednak taka parametryzacja modelu kowariancji, aby uzyskać fizjologicznie uzasadnione wyniki.

3.3.3.1. Kowarianty ciągłe

Prostym sposobem na uwzględnienie kowarianty ciągłej w modelu populacyjnym jest zależność liniowa w postaci:

$$CL_i = (\theta_1 + BW_i \cdot \theta_2) \cdot \exp(\eta_{1,i}) \quad (12)$$

gdzie BW (ang. *body weight*) to masa ciała, θ_1 to część klirensu niezależna od masy ciała, a θ_2 to część klirensu, która zależy od masy ciała pacjenta. Funkcja ta spełnia założenia modelu zagnieżdżonego, ponieważ model wyjściowy jest jej szczególnym przypadkiem dla $\theta_2=0$. Taka parametryzacja ma jednak wiele wad, ponieważ zakłada liniową zależność między parametrem a zmienną towarzyszącą, która rzadko kiedy jest prawdziwa. Ponadto ogranicza możliwości ekstrapolacji modelu. Bardziej popularnymi funkcjami są funkcja potęgowa i wykładnicza.

Ważnym elementem modelu kowariancji jest centrowanie lub normalizacja zmiennej towarzyszącej wokół wartości średniej bądź referencyjnej (np. 70 kg dla masy ciała). Centrowanie w postaci:

$$CL_i = \theta_1 \cdot (BW_i - 70)^{\theta_2} \cdot \exp(\eta_{1,i}) \quad (13)$$

powinno być używane ze szczególną uwagą, gdyż istnieje ryzyko uzyskania ujemnej wartości parametru, gdy zmienna towarzysząca ma niewielką wartość. Problem ten znika przy zastosowaniu normalizacji:

$$CL_i = \theta_1 \cdot \left(\frac{BW_i}{70}\right)^{\theta_2} \cdot \exp(\eta_{1,i}) \quad (14)$$

Przy takiej parametryzacji θ_1 jest wartością klirensu dla referencyjnego pacjenta o masie ciała 70 kg [4].

Zmienność parametrów farmakokinetycznych może być przewidywana dzięki zastosowaniu skalowania allometrycznego. Koncepcja allometrii polega na powiązaniu funkcji i morfologii organizmu z jego rozmiarem. Podstawową funkcją stosowaną do skalowania allometrycznego jest funkcja potęgowa o postaci ogólnej:

$$P = a \cdot BW^b \quad (15)$$

wiążąca własność organizmu P dla indywidualnego pacjenta (np. aktywność metaboliczną) z jego masą ciała BW przy pomocy dwóch parametrów: a (wartość P dla $BW=1$) oraz b (parametr skalujący). Typowa wartość parametru b dla aktywności metabolicznej organizmu to $\frac{3}{4}$. Funkcja ta jest szeroko stosowana do przewidywania klirensu na podstawie masy ciała pacjenta:

$$CL_i = CL_{70} \cdot \left(\frac{BW_i}{70}\right)^{3/4} \quad (16)$$

Do przewidywania objętości dystrybucji poszczególnych kompartmentów przy pomocy masy ciała stosuje się model o wartości wykładnika b równej 1:

$$V_i = V_{70} \cdot \left(\frac{BW_i}{70}\right)^1 \quad (17)$$

Parametr skalujący b może mieć ustaloną wartość ($\frac{3}{4}$ dla klirensu, 1 dla objętości), ale może być również estymowany jako parametr modelu. Często jednak oszacowana wartość parametru jest bardzo zbliżona do wartości teoretycznych. Koncepcja skalowania allometrycznego znajduje potwierdzenie w wielu rzeczywistych obserwacjach, co czyni ją bardzo uniwersalną i szeroko stosowaną metodą [9-11].

Po uwzględnieniu zależności między parametrami farma kinetycznymi a rozmiarem ciała, możliwa jest ocena wpływu innych zmiennych towarzyszących. W populacji niemowląt szczególnie istotne jest wykorzystanie wieku do opisu dojrzewania klirensu. Dojrzewanie to rozpoczyna się już przed narodzinami, stąd częste użycie wieku ciążowego (ang. *postmenstrual age*, *PMA*) zamiast wieku pourodzeniowego (ang. *postnatal age*, *PNA*) w funkcjach opisujących dojrzewanie (ang. *maturation function*, *MF*). Popularnym modelem wykorzystywanym do tego celu jest sigmoidalna funkcja Hilla, która zakłada stopniowe dojrzewanie klirensu w początkowym okresie życia i osiągnięcie klirensu osoby dorosłej w wieku późniejszym. Wykorzystanie informatywnej funkcji dojrzewania zdolnej do ekstrapolacji oraz uwzględnienie rozmiaru

ciała jako kowarianty umożliwia przewidywanie klirensu dla populacji dorosłych na podstawie danych uzyskanych z populacji pediatrycznej. Natomiast próby skalowania danych uzyskanych od dorosłych w celu przewidywania klirensu u niemowląt są podejściem nierzetelnym, ponieważ nieznaną jest szybkość ani stopień dojrzewania klirensu. Funkcja Hilla ma postać:

$$MF_i = \frac{PMA_i^{Hill}}{PMA_i^{Hill} + PMA_{50}^{Hill}} \quad (18)$$

gdzie PMA_{50} to wiek ciążowy, dla którego osiągnąta jest połowa wartości klirensu osoby dorosłej, a Hill to współczynnik Hilla. PMA_{50} oraz współczynnik Hilla są estymowanymi parametrami modelu. Funkcja dojrzewania uwzględniana jest w modelu populacyjnym w następujący sposób:

$$CL_i = CL_{70} \cdot \left(\frac{BW_i}{70}\right)^{3/4} \cdot MF_i \quad (19)$$

Należy jednak pamiętać o tym, że model z uwzględnioną funkcją dojrzewania nie jest modelem zagnieżdżonym, w związku z czym nie może być porównywany z modelami alternatywnymi przy użyciu testu ilorazu wiarygodności [11,12].

3.3.3.2. Kowarianty dyskretne

Zmienne towarzyszące o charakterze dyskretnym możemy podzielić na dwie klasy: zmienne dwumianowe (dychotomiczne), przyjmujące tylko 2 wartości oraz zmienne wielomianowe (polichotomiczne), przyjmujące więcej niż 2 wartości.

Zmienne dwumianowe można w prosty sposób zakodować, przypisując poszczególnym poziomom zmiennej wartości 0 i 1. Zależność klirensu od płci pacjenta (dla mężczyzn $PŁĘĆ=0$, dla kobiet $PŁĘĆ=1$) można zapisać w następujący sposób:

$$CL_i = \theta_1 + \theta_2 \cdot PŁĘĆ_i \quad (20)$$

gdzie θ_1 jest klirensem dla mężczyzn, a θ_2 zmianą klirensu związana z płcią żeńską.

Zmienne wielomianowe nominalne można modelować analogicznie poprzez przypisanie wartości różnym kategoriom lub przyporządkowanie zmiennych do 2 kategorii ze względu na podobieństwo spowodowane inną kowariantą [4,13].

3.3.4. Metody estymacji parametrów

Większość programów do NLMEM opiera się na estymacji parametrów poprzez poszukiwanie minimum funkcji celu. Funkcja celu jest miarą różnicy pomiędzy danymi zaobserwowanymi a przewidywaniami modelu dla określonych wartości parametrów [3]. Zastosowanie mają różne funkcje celu, takie jak metoda najmniejszych kwadratów oraz metoda największej wiarygodności [3]. Dopasowanie parametrów modelu odbywa się przy pomocy szacowania pochodnych cząstkowych funkcji celu dla każdego parametru θ . Optymalizacja polega na przyrównaniu pochodnych cząstkowych do zera. Parametry spełniające to założenie są otrzymywane w procesie iteracyjnym, poprzez poszukiwanie wartości parametrów, które minimalizują wartość funkcji celu.

Najpopularniejszym podejściem w NLMEM jest szacowanie parametrów z wykorzystaniem metody największej wiarygodności. Najlepszymi szacunkami parametrów modelu są takie wartości, które maksymalizują prawdopodobieństwo zaobserwowania stężeń zgodnych z rzeczywistymi oznaczeniami. Wymaga to przyjęcia założeń na temat nieznanego rozkładu zmienności międzypersonicznej parametrów farmakokinetycznych. Funkcja wiarygodności opisująca zaobserwowanie całego zestawu danych jest iloczynem wiarygodności zaobserwowania indywidualnych pomiarów [4,14].

Rozkład brzegowy funkcji wiarygodności dla i -tego pacjenta $L_i(\psi, \Omega | y_{i,j})$, gdzie ψ oznacza wektor parametrów typowych (θ) wraz z macierzą wariancji-kowariancji dla reszt (Σ) dany jest całką:

$$L_i(\psi, \Omega | y_{i,j}) = p(y_{i,j} | \psi, \Omega) = \int p(y_{i,j} | \eta_i, \psi) \cdot p(\eta_i | \Omega) d\eta_i \quad (21)$$

gdzie $p(y_{i,j} | \eta_i, \psi)$ jest rozkładem warunkowym $y_{i,j}$ pod warunkiem zmienności międzypersonicznej η_i , a $p(\eta_i | \Omega)$ jest nieznanym rozkładem η_i [15]. Dla nieliniowego modelu efektów mieszanych powyższa całka nie może zostać rozwiązana analitycznie, ponieważ ε i η są ze sobą skorelowane – macierz wariancji-kowariancji dla reszt zależy od oszacowania macierzy wariancji-kowariancji dla zmienności międzypersonicznej. Wymusza to zastosowanie różnego rodzaju algorytmów numerycznej aproksymacji [8].

Wartość funkcji celu (ang. *objective function value, OFV*) oparta na MNW wyrażana jest najczęściej jako podwojona wartość ujemnego logarytmu z wartości funkcji wiarygodności (ang. *minus twice the log of the likelihood, -2LL*), co znacznie ułatwia obliczenia. OFV to liczba opisująca jak bardzo wartości przewidziane przez model zgodne są z rzeczywistymi pomiarami.

3.3.5. Porównywanie modeli populacyjnych

Wartość minimum funkcji celu jest stosowana podczas porównywania i rangowania modeli. Bardziej skomplikowane modele z większą ilością parametrów na ogół lepiej opisują dane, jednakże przy porównywaniu kilku modeli należy wziąć pod uwagę polepszenie dopasowania w odniesieniu do stopnia skomplikowania modelu. Do tego typu porównań stosowane są: kryterium informacyjne Akaike (ang. *Akaike information criterion, AIC*) oraz bayesowskie kryterium informacyjne (ang. *Bayesian information criterion, BIC*):

$$AIC = -2LL + 2n_{par} \quad (22)$$

$$BIC = -2LL + 2n_{par} \cdot \ln(N) \quad (23)$$

gdzie n_{par} to liczba parametrów w modelu, a N to liczba pomiarów. Nie istnieją formalne testy porównujące wartości AIC i BIC dla poszczególnych modeli. W praktyce spadek wartości każdego z kryteriów o wartość co najmniej 2 pomiędzy dwoma modelami daje podstawę do rozważenia odrzucenia jednego modelu na korzyść drugiego [4].

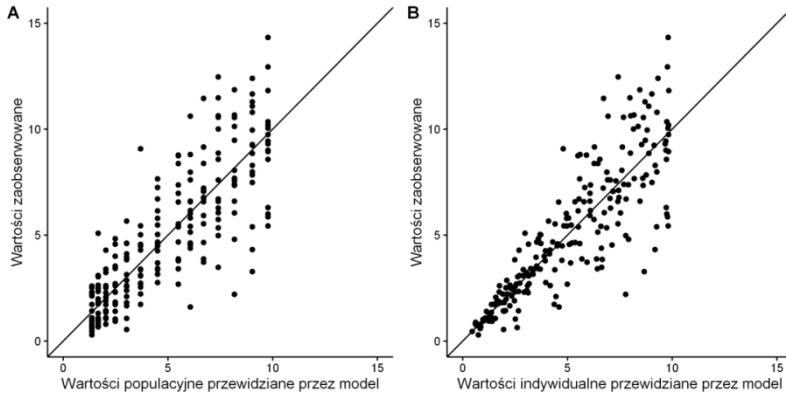
Test ilorazu wiarygodności (ang. *Likelihood ratio test, LRT*) stosowany jest do porównywania dwóch modeli zagnieżdżonych, z których model prostszy (tzw. zredukowany) jest pewnym szczególnym przypadkiem modelu bardziej złożonego, posiadającego większą liczbę parametrów. Dla prawdziwej hipotezy zerowej (oba modele tak samo dobrze opisują dane), LRT ma rozkład graniczny χ^2 z liczbą stopni swobody równą różnicy liczby parametrów pomiędzy modelem złożonym i zredukowanym. Test ten jest szczególnie użyteczny przy porównywaniu modelu wyjściowego z modelami uwzględniającymi kowarianty [4].

3.3.6. Graficzna diagnostyka modelu

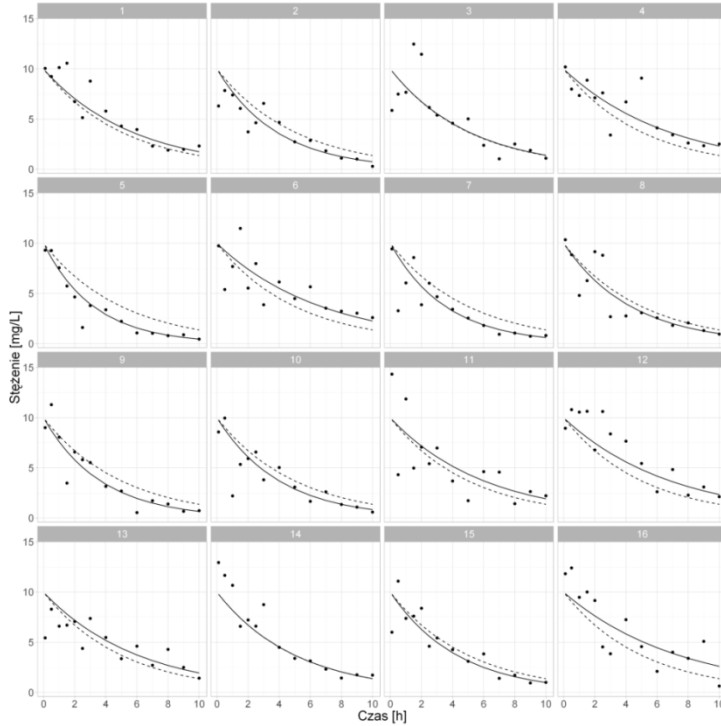
Wstępna graficzna analiza jakości dopasowania modelu populacyjnego (ang. *goodness-of-fit, GOF*) powinna zawierać następujące wykresy [4]:

Zależność wartości populacyjnych (Rys. 3A) oraz indywidualnych (Rys. 3B) przewidzianych przez model od wartości obserwowanych, często z nałożoną linią jedności ($y=x$). Model powinien wykazywać losową zmienność wokół linii jedności. Systematyczne odchylenia świadczą o niedopasowaniu modelu.

Zależność wartości obserwowanych, przewidywań populacyjnych i przewidywań indywidualnych od czasu. Jeśli liczba badanych jest niewielka, każdy z nich może zostać przedstawiony na osobnym panelu (Rys. 4). Stężenia przewidziane dla indywidualnego pacjenta powinny dobrze opisywać zaobserwowane dane, natomiast stężenia populacyjne odzwierciedlają pacjenta typowego dla badanej populacji.



Rysunek 3. Zależność wartości A – populacyjnych oraz B – indywidualnych przewidzianych przez model od wartości obserwowanych [opracowanie własne]



Rysunek 4. Zależność wartości obserwowanych (punkty), przewidywań populacyjnych (linia przerywana) i przewidywań indywidualnych (linia ciągła) od czasu [opracowanie własne]

Podstawą oceny dopasowania modelu do danych jest analiza reszt, będących różnicami pomiędzy obserwacjami a wartościami przewidzianymi przez model [8].

$$\varepsilon_{i,j} = C(t)_{i,j} - \widehat{C}(t)_{i,j} \quad (24)$$

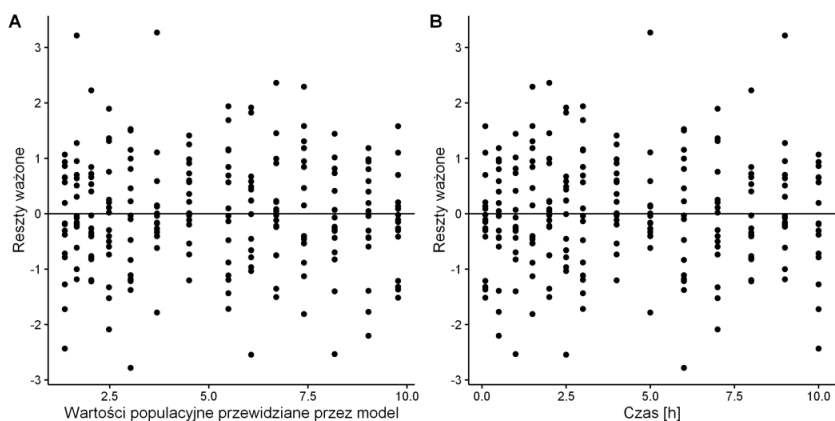
Dodatnie wartości reszt świadczą o niedoszacowaniu wartości przewidzianych przez model, natomiast ujemne wartości reszt świadczą o ich przeszacowaniu. Analiza reszt pozwala na wykrycie wartości odstających (ang. *outliers*) oraz pomaga ocenić prawidłowość założeń modelu.

Bezwzględna wartość reszt zależy od rzędu wielkości danych, co utrudnia ocenę ich rozkładu. Zastosowanie reszt ważonych pozwala na znormalizowanie reszt w taki sposób, że odchylenie standardowe przyjmuje wartość 1. Przedstawienie na wykresie reszt ważonych umożliwia ich prawidłową ewaluację. Metody ważenia zależne są od użytych metod estymacji [4]. Zakłada się, że jeśli zastosowany model jest prawidłowy, reszty ważone powinny być niezależne i opisane rozkładem normalnym o średniej 0 i wariancji σ^2 .

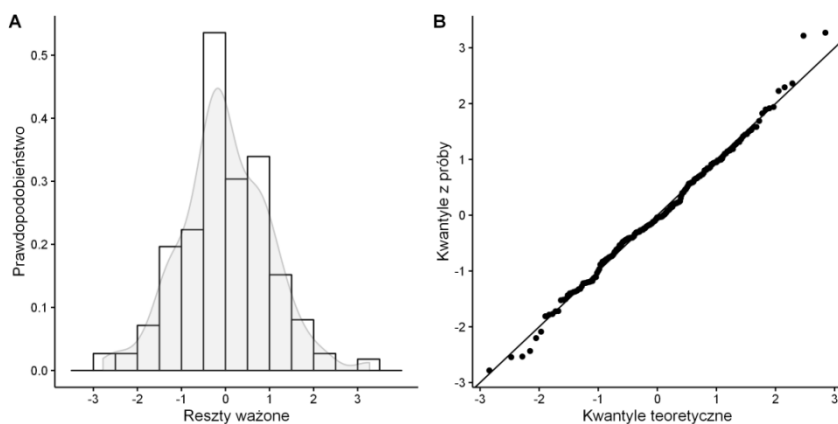
Diagnostyka modelu na podstawie analizy reszt opiera się głównie na graficznej ocenie systematycznych zależności oraz odchylen od wartości oczekiwanych. Podstawowe wykresy diagnostyczne oparte na analizie reszt obejmują:

- Zależność reszt ważonych od wartości przewidzianych przez model (Rys. 5A). Na wykresie nie powinien być widoczny żaden trend – punkty powinny być rozmieszczone losowo. Na skali dla reszt ważonych wartość 1 jest równa jednemu odchyleniu standardowemu, stąd punkty leżące poza zakresem ± 3 powinny zostać zbadane jako potencjalne wartości odstające. Każdy widoczny trend może świadczyć o niedopasowaniu modelu.
- Zależność reszt ważonych od czasu (Rys. 5B). Na wykresie powinna być widoczna losowa zmienność skupiona wokół zera, a większość punktów powinna leżeć w zakresie ± 2 .

Histogram reszt ważonych (Rys. 6A). Powinien przyjmować kształt rozkładu normalnego ze środkiem masy zlokalizowanym wokół zera. Alternatywą dla histogramu jest wykres kwantyl-kwantyl (Ryc. 6B). Punkty powinny układać się na jednej linii, odchylenia od prostej świadczą o odchyleniu od rozkładu normalnego.



Rysunek 5. Graficzna analiza reszt: A – zależność reszt ważonych od wartości przewidzianych przez model, B – zależność reszt ważonych od czasu [opracowanie własne]



Rysunek 6. Graficzna analiza rozkładu reszt: A – histogram reszt ważonych, B – wykres kwantyl-kwantyl [opracowanie własne]

3.3.7. Precyzja oszacowania parametrów

Precyzja oszacowania parametrów przedstawiana jest na podstawie kształtu powierzchni funkcji wiarygodności wokół najlepszego dopasowania parametrów. Precyzję można wyrazić przy pomocy błędu standardowego (ang. *standard error*, *SE*) lub przedziałów ufności (ang. *confidence intervals*, *CI*). Precyzyjne oszacowanie parametrów jest istotne, jednak dopuszczalne wartości precyzji różnią się w zależności od ilości danych. Akceptowalnymi wartościami jest $SE < 30\%$ dla efektów stałych i $< 50\%$ dla efektów losowych [4].

Alternatywę dla estymacji precyzji parametrów stanowią metody bootstrapowe, polegające na wielokrotnym losowaniu ze zwracaniem. Przedziały ufności oparte na błędzie standardowym estymat parametrów są często niedoszacowane ze względu na założenie normalności danych farmakokinetycznych, które nie zawsze jest prawdziwe. Nieparametryczne metody bootstrapowe omijają to założenie. Bootstrap nieparametryczny polega na wielokrotnym generowaniu zbiorów danych, w których znajdują się pacjenci losowo wybrani z oryginalnego zestawu danych. Każdy pacjent może znaleźć się w wylosowanym zbiorze kilkakrotnie lub w ogóle się w nim nie pojawić. Aby odpowiednio odzwierciedlić rozkład parametrów, generuje się zwykle nie mniej niż 1000 losowych zestawów danych, które analizuje się następnie przy pomocy ostatecznego modelu. Bootstrapowe przedziały ufności konstruuje się przy pomocy 5. i 95. percentyla parametrów uzyskanych z ewaluacji wylosowanych zbiorów danych [4].

3.4. Techniki bayesowskie

Estymacja bayesowska to technika, która pozwala na uwzględnienie informacji znanych przed zebraniem danych eksperymentalnych w zestawieniu z zaobserwowanymi danymi w celu oszacowania najbardziej prawdopodobnych wartości parametrów w badanej populacji. W farmakokinetyce oznacza to zastosowanie założeń *a priori* o strukturze modelu populacyjnego i wartościach parametrów populacyjnych z uwzględnieniem niepewności ich oszacowania. Na podstawie tych informacji można oszacować parametry farmakokinetyczne dla pacjenta, nawet przy bardzo niewielkiej ilości zmierzonych stężeń [16]. Zaletą tego podejścia jest fakt, że udział każdego pacjenta w estymacji parametrów populacyjnych jest ważony odpowiednio w zależności od ilości pomiarów zebranych od tego pacjenta [1].

W podejściu bayesowskim przyjmowane są założenia *a priori* dotyczące typowych wartości parametrów w populacji oraz ich zmienności. Następnie informacje pochodzące z otrzymanych danych weryfikują przyjęte założenia.

W kontekście farmakokinetyki teoria Bayesa może być przedstawiona w postaci:

$$p(\Phi|C) = \frac{p(\Phi)p(C|\Phi)}{p(C)} \quad (25)$$

gdzie Φ to wektor wszystkich parametrów modelu, a C to wektor zmierzonych stężeń. Prawdopodobieństwa definiowane są jako:

$p(\Phi|C)$ – prawdopodobieństwo warunkowe (*a posteriori*) parametrów Φ przy danych stężeniach C

$p(\Phi)$ – prawdopodobieństwo *a priori* parametrów Φ

$p(C|\Phi)$ – rozkład prawdopodobieństwa stężeń C warunkowany danym zestawem parametrów Φ (nazywany funkcją wiarygodności)

$p(C)$ – prawdopodobieństwo *a priori* stężeń C

W odróżnieniu od NLMEM, w wyniku estymacji bayesowskiej zamiast zestawu najlepiej dopasowanych parametrów otrzymuje się cały rozkład parametrów *a posteriori*. Estymacja oparta jest na zaobserwowanych danych oraz informacji *a priori*, dzięki czemu brak danych może zostać skompensowany informacją z rozkładu *a priori* [7]. Szczególnie przydatną cechą podejścia bayesowskiego jest odporność na dane odbiegające w znacznym stopniu od średniej poprzez zastosowanie innego niż normalny rozkładu dla reszt, np. rozkład t-Studenta.

4. Wnioski

Podejście populacyjne do modelowania farmakokinetycznego to wciąż stosunkowo nowa, lecz szybko rozwijająca się dziedzina. Zaawansowane metody modelowania populacyjnego mogą przy pierwszym kontakcie wydawać się skomplikowane, jednak ze względu na korzyści płynące z ich użycia, znajdują coraz szersze zastosowanie zarówno w procesie odkrywania i rejestracji nowych leków, jak i w praktyce klinicznej. Modelowanie populacyjne umożliwia poznanie i opisanie procesów zachodzących w organizmie po podaniu leku, bez konieczności zbierania wielu próbek od każdego pacjenta. Możliwość precyzyjnej symulacji na podstawie zbudowanych modeli populacyjnych jest potężnym narzędziem dla optymalizacji farmakoterapii – umożliwia dobór dawek podczas wszystkich faz badań klinicznych, a także w przebiegu rutynowej terapii monitorowanej. Identyfikacja czynników wpływających na zmienność parametrów farmakokinetycznych pozwala na ustalenie optymalnej strategii dawkowania dla populacji, subpopulacji lub pojedynczego pacjenta. Uwzględniając w modelu kowarianty, możliwe jest także rozszerzenie przewidywań na populacje bezpośrednio nie poddane badaniu. Odpowiedni dobór dawki dla każdego pacjenta znacznie zwiększa efektywność farmakoterapii, obniżając odsetek niepowodzeń terapii spowodowanych przyjmowaniem dawek toksycznych lub subterapeutycznych. Implementacja modeli populacyjnych w praktyce klinicznej jest więc niekwestionowanym krokiem w kierunku terapii personalizowanej.

Literatura

1. Wright, P.M. *Population based pharmacokinetic analysis: why do we need it; what is it; and what has it told us about anaesthetics?* Br. J. Anaesth., (1998) 80 (4), s. 488-501
2. Sherwin, C.M.T., Kiang, T.K.L., Spigarelli, M.G., and Ensom, M.H.H. *Fundamentals of Population Pharmacokinetic Modelling*. Clin. Pharmacokinet., (2012) 51 (9), s. 573-590
3. Barrett, J. *Population Pharmacokinetics*, w: *Pharmacokinetics in Drug Discovery and Development*, CRC Press (2002), s.315-356.
4. Mould, D.R., and Upton, R.N. *Basic Concepts in Population Modeling, Simulation, and Model-Based Drug Development—Part 2: Introduction to Pharmacokinetic Modeling Methods*. CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol., (2013) 2 (4), s. e38
5. Owen, J.S., and Fiedler-Kelly, J. *Population Model Concepts and Terminology*, w: *Introduction to Population Pharmacokinetic / Pharmacodynamic Analysis with Nonlinear Mixed Effects Models*, John Wiley & Sons, Inc, (2014) s. 9-27
6. Gobburu, J.V.S. *Pharmacometrics 2020*. J. Clin. Pharmacol., (2010) 50 (S9), s. 151S-157S
7. Rodman, J.H., D'Argenio, D.Z., and Peck, C.C. *Analysis of pharmacokinetic data for individualizing drug dosage regimens*, w: *Applied pharmacokinetics & pharmacodynamics: principles of therapeutic drug monitoring*, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, (2006) s. 41-59
8. Bonate, P.L. *Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling and Simulation*, Springer US, Boston, MA (2011)
9. Peters, R.H. *Physiological correlates of size*, w: *The ecological implications of body size*, Cambridge University Press, (1983) s. 45-53
10. Holford, N.H.G. *A Size Standard for Pharmacokinetics*. Clin. Pharmacokinet., (2012) 30 (5), s. 329-332
11. Anderson, B.J., and Holford, N.H.G. *Mechanism-Based Concepts of Size and Maturity in Pharmacokinetics*. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., (2008) 48 (1), s. 303-332
12. Tod, M., Jullien, V., and Pons, G. *Facilitation of Drug Evaluation in Children by Population Methods and Modelling*. Clin. Pharmacokinet., (2012) 47 (4), s. 231-243
13. Owen, J.S., and Fiedler-Kelly, J. *Model Building: Typical Process*, w: *Introduction to Population Pharmacokinetic / Pharmacodynamic Analysis with Nonlinear Mixed Effects Models*, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey, (2014) s. 90-177
14. Olofsen, E., Dinges, D.F., and Van Dongen, H.P.A. *Nonlinear mixed-effects modeling: individualization and prediction*. Aviat. Space. Environ. Med., (2004) 75 (3 Suppl), s. A134-40
15. Wang, Y. *Derivation of various NONMEM estimation methods*. J. Pharmacokinet. Pharmacodyn., (2007) 34 (5), s. 575-593
16. Owen, J.S., and Fiedler-Kelly, J. *Applications Using Parameter Estimates From The Individual*, w: *Introduction to Population Pharmacokinetic / Pharmacodynamic Analysis with Nonlinear Mixed Effects Models*, John Wiley & Sons, Inc, (2014) s. 9-27

Podejście populacyjne do modelowania farmakokinetyki leków

Streszczenie

Farmakokinetyka opisuje zmiany stężenia leku w organizmie wraz z upływem czasu po podaniu dawki. W tradycyjnym ujęciu analiza farmakokinetyczna polega na oszacowaniu parametrów farmakokinetycznych na podstawie obserwacji pochodzących od poszczególnych pacjentów. Opieranie się na indywidualnych parametrach w celu przewidywania stężeń leku u kolejnego pacjenta obarczone jest dużym błędem ze względu na zróżnicowanie populacji pod względem płci, wieku, stanu zdrowia, przyjmowanych leków czy metabolizmu. Celem populacyjnego modelowania farmakokinetyki jest opis zmienności parametrów farmakokinetycznych w populacji i wyjaśnienie części zmienności międzyosobniczej przy pomocy kowariant. Metody stosowane do estymacji parametrów populacyjnych to: data pooling, metoda dwuetapowa, nieliniowe modelowanie efektów mieszanych oraz techniki bayesowskie. Nieliniowe modelowanie efektów mieszanych jest obecnie synonimem modelowania populacyjnego, w którym dane pochodzące od całej przebadanej populacji analizowane są jednocześnie, jednak z zachowaniem rozróżnienia na poszczególnych pacjentów. Podejście populacyjne do modelowania farmakokinetyki to zaawansowana i szybko rozwijająca się dziedzina. Jest elementem niezbędnym w procesie opracowywania nowych leków oraz ich rejestracji. Umożliwia indywidualizację i optymalizację farmakoterapii, zwiększając tym samym jej bezpieczeństwo.

Słowa kluczowe: farmakokinetyka populacyjna, modelowanie farmakokinetyczne

Population approach to pharmacokinetic modeling

Abstract

Pharmacokinetics describes the changes of drug concentration in time after dose administration. Traditional pharmacokinetic analysis estimates pharmacokinetic parameters based on observations from individual patients. Prediction of the concentrations in another patient based on such individual parameters is encumbered with error due to the variability of the population in terms of gender, age, health status, medication and metabolism. The aim of population pharmacokinetic modeling is to describe the variability of pharmacokinetic parameters in the population and explain part of the inter-individual variability with covariates. The methods used to estimate population parameters include naïve pooled data, two-stage method, non-linear mixed effects modeling and Bayesian techniques. Non-linear mixed effects modeling is currently used a synonym for population modeling. It allows the data derived from the entire study population to be analyzed simultaneously, while still maintaining the recognition between individual patients. Population approach to pharmacokinetic modeling is an advanced and rapidly developing field. It is essential in the development and registration of new drugs as well as in individualization and optimization of routine pharmacotherapy.

Keywords: population pharmacokinetics, pharmacokinetic modeling

Próba zastosowania ekstraktu z *Echinacea purpurea* w zwalczaniu bakterii patogennych wywołujących *mastitis* u krów

1. Wprowadzenie

Zapalenie gruczołu mlekowego, czyli *mastitis* to obok niepłodności i zaburzeń na tle metabolicznym najpoważniejsze źródło strat ekonomicznych w produkcji mleka. *Mastitis* jest jednostką chorobową występującą zarówno u wysokowydajnych krów w stadach wielko-towarowych, jak i u tych charakteryzujących się mniejszą produktywnością w gospodarstwach niskonakładowych m.in. ekologicznych.

Wśród czynników etiologicznych *mastitis* dominują różnego rodzaju drobnoustroje. Integralną częścią leczenia i profilaktyki *mastitis* jest antybiotykoterapia – stosowana zarówno w celu zredukowania poziomu zakażeń, jak i w przypadku ich prewencji np. w okresie zasuszenia na 4 do 8 tygodni przed planowanym wycieleniem. Nadmierne stosowanie antybiotyków w produkcji zwierzęcej sprzyja tworzeniu się szczepów silnie patogennych i lekoopornych, co w konsekwencji sprzyja powstawaniu nowych, łatwo rozprzestrzeniających się zakażeń (często wtórnych). Hodowcy bydła mlecznego ponoszą wtedy duże straty finansowe wynikające z prewencji lub z leczenia zdiagnozowanych już zakażeń. Problem ten jest o wiele bardziej kłopotliwy i kosztowny w przypadku produkcji w gospodarstwach ekologicznych. Rolnictwo ekologiczne jest alternatywnym do rolnictwa konwencjonalnego systemem gospodarowania i produkcji żywności. Rolnictwo ekologiczne produkuje żywność metodami naturalnymi w czystym i bezpiecznym środowisku, z wyłączeniem nawozów sztucznych i syntetycznych środków ochrony roślin, także antybiotyków oraz hormonów, stymulatorów wzrostu i genetycznie modyfikowanych organizmów [1]. Wszelkie zabiegi dotyczące zdrowia krów w gospodarstwach ekologicznych powinny być ukierunkowane przede wszystkim na poprawę dobrostanu zwierząt, który stanowi jeden

¹ Zakład Hodowli Bydła, Katedra Szczegółowej Hodowli Zwierząt Wydział Nauk o Zwierzętach

*Wydział Rolnictwa i Biologii, SGGW

*autor korespondencyjny: Weronika Serafin e-mail: weronikaserafin@vp.pl

z kluczowych priorytetów wspólnej gospodarki rolnej na 2014-2020 lata [2]. Zachowanie dobrostanu krów użytkowanych mlecznie wiąże się z zabiegami profilaktycznymi, takimi jak: dobór odpowiednich ras, prowadzenie chowu w warunkach zgodnych z wymaganiami gatunku, dostęp do świeżego powietrza, wody, paszy i naturalnego światła, stosowanie wysokiej jakości pasz w połączeniu z dostępem do wybiegów i pastwisk. Zabronione jest natomiast profilaktyczne stosowanie chemicznie syntetyzowanych leków weterynaryjnych (leków alopatycznych) i antybiotyków. Obecnie zwraca się szczególną uwagę na ograniczanie stosowania antybiotyków zarówno w leczeniu, jak i w terapii osłonowej podczas okresu zasuszania, w związku z tym coraz częściej podejmowane są próby wykorzystania fitobiotyków. W gospodarstwach ekologicznych rolnicy starają się wdrażać alternatywne rozwiązania, poprzez stosowanie produktów wytworzonych na bazie ziół. W składzie różnych preparatów ziołowych można spotkać takie składniki jak: rumianek, szalwia, kamfora, lawenda lekarska, jeżówka purpurowa, olejek z drzewa herbacianego, olej rokitnikowy, czy eukaliptus gałkowy. Jednym z naturalnych preparatów, który może być wykorzystywany w leczeniu *mastitis* jest ekstrakt z jeżówki purpurowej (*Echinacea purpurea*). Jeżówka purpurowa ma zdolność aktywacji odpowiedzi immunologicznej organizmu potwierdzoną poprzez zwiększenie sekrecji laktoferyny w mleku [3, 4]. Laktoferyna jest składnikiem powszechnie występującym w płynach ustrojowych ssaków, w tym również w mleku i wykazuje szerokie spectrum działania: obok immunostymulującego, przede wszystkim przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze i przeciwwirusowe. Jak podają Litwińczuk i wsp. [5] poziom laktoferyny zwiększa się średnio 2-krotnie w mleku o podwyższonej liczbie komórek somatycznych, najbardziej u krów rasy Simentaler w okresie żywienia letniego.

2. Cel pracy

Celem pracy było zbadanie i zweryfikowanie wpływu ekstraktu jeżówki purpurowej (*Echinacea purpurea*) na zahamowanie wzrostu i rozwoju bakterii patogennych wywołujących zapalenie gruczołu mlekowego, u krów z diagnozą przewlekłego stanu zapalenia wymienia utrzymującego się od kilku miesięcy – ze "skaczącą" LKS- Liczbą Komórek Somatycznych (przypis auterek: w jednym miesiącu referencyjna dla mleka klasy ekstra w kolejnym natomiast dla mleka mastitowego). Część eksperymentalna pracy dotyczyła badania jakości cytologicznej i mikrobiologicznej materiału badawczego, jakim było mleko pochodzące od krów u których zastosowano ekstrakt jeżówki purpurowej – w postaci aplikacji maści na wymiona po zakończonym doju.

3. Materiał i metody

Badaniem było objętych 20 krów rasy Polskiej Holsztyńsko-Fryzyjskiej (PHF), u których zdiagnozowany został utrzymujący się od kilku miesięcy przewlekły stan zapalny wymienia. Czynnikiem eksperymentalnym w doświadczeniu było zastosowanie maści na bazie ekstraktu jeżówki purpurowej (*Echinacea purpurea*) bezpośrednio na wymiona, po każdym doju w ciągu dnia tzn. 2-krotnie, przez okres 14 dni. Kontrolę stanowiło mleko pobrane od krów przed rozpoczęciem stosowania preparatu, a grupę doświadczalną mleko pozyskane po 7. i 14. dniach jego stosowania. Eksperyment przeprowadzono w prywatnym certyfikowanym gospodarstwie rolnym specjalizującym się w produkcji mleka, utrzymującym stado krów rasy PHF liczące ponad 120 sztuk. W badanym stadzie wydajność mleczna w bieżącym roku była na poziomie 4.283 kg, zawartość tłuszczu 4,24%, a białka 3,51%. Materiał badawczy stanowiły próbki mleka, które pobierano w sierpniu w czasie porannego doju na początku (kontrola), po 7. i 14. dniach doświadczenia (grupa doświadczalna) do sterylnych plastikowych pojemników zgodnie z procedurą opisaną przez Kuczyńską i Puppel [6]. Następnie próbki mleka przewożone były w izotermicznym boksie (w temperaturze 4°C) do laboratorium Oceny Jakości Mleka Zakładu Hodowli Bydła SGGW. Bezpośrednio po dostarczeniu do laboratorium oznaczano jakość higieniczną mleka na podstawie:

- ogólnej liczby bakterii (OLB) określanej metodą posiewu spiralnego, przy użyciu aparatu WASP (Bentley), hodowli przez 24, 48 i 72 godz., w temperaturze 30°C i zliczaniu jednostek tworzących kolonie (j.t.k.) na automatycznym liczniku CounterMat Flash (Bentley) wyposażonym w kamerę video i specjalistyczne oprogramowanie;
- liczby komórek somatycznych (LKS) oznaczonej metodą cytometrii przepływowej przy wykorzystaniu aparatu SomaCount 150 (Bentley).

Drobnoustroje identyfikowane były wstępnie na podstawie właściwości fenotypowych. Dla gronkowców było to wytwarzanie katalazy, koagulazy i hemolizy. Dla pałeczek Gram-ujemnych był to rozkład laktozy. W celu identyfikacji poszczególnych szczepów bakteryjnych zastosowano podłoża różnicujące (diagnostyczne), pozwalające na wykrycie niektórych cech fizjologicznych i biochemicznych bakterii:

- McConkeya, na którym następuje rozkład laktozy w celu identyfikacji pałeczek gram-ujemnych,
- Columbia, na którym następuje tworzenie hemolizy,
- agar czekoladowy (wzrost) w celu wykrycia *Haemophilus*.

Dodatkowo zastosowano testy umożliwiające wykrycie wytwarzania katalazy i koagulazy w celu identyfikacji gronkowców.

4. Analiza wyników badań

Badania wykazały korzystny wpływ maści na bazie ekstraktu z jeżówki purpurowej (*Echinacea purpurea*), który został potwierdzony poprawą jakości cytologicznej mleka (tab. 1). Obniżenie liczby komórek soma tycznych (LKS) wykazano zarówno po 7., jak i po 14. dniach aplikacji maści. Pozytywną odpowiedź ze strony układu immunologicznego krów uzyskano w przypadku 70,0% i 65,0% chorych krów, odpowiednio po 7. i 14. dniach aplikowania maści. W dostępnej literaturze można znaleźć różne granice progowe dotyczące poziomu komórek somatycznych w mleku krowim świadczące o zdiagnozowaniu stanu wymienia jako zainfekowanego lub zdrowego. Zgodnie z normą PN-A- 86002:1999 mleko klasy ekstra nie może zawierać więcej niż 400 tys./cm³, komórek somatycznych [7]. Znacznie bardziej restrykcyjne wartości graniczne przyjęli Schepers i wsp. [8] – 200 tys./cm³, oraz Harmon [9] – 50 tys./cm³. Mleko krów wybranych do eksperymentu w badaniach własnych charakteryzowało się wysoką liczbą komórek somatycznych na początku doświadczenia znacznie przekraczającą wymienione przez tych autorów granice progowe. W badaniach Reklewskiej i wsp., [3] w wyniku stosowania Echinapur poziom LKS w mleku uległ obniżeniu o 53%. Ponadto wykazano, że ekstrakt *Echinaceae purpurea* stymuluje wydzielanie laktoferyny i zwiększa produkcję leukocytów. W wyniku stosowania preparatu wykazana została zwiększona aktywność fagocytozy neutrofilów obojętno-chłonnych, natomiast w przypadku makrofagów zwiększona produkcja cytokin i interferonu. Ponadto, stwierdzono, że po zakończeniu stosowania preparatu liczba komórek somatycznych w mleku nadal wykazywała wcześniej zaobserwowany trend, a po miesiącu od zakończonego eksperymentu uległa obniżeniu o 89,3%, w stosunku do poziomu początkowego. Wskazuje to na skuteczność długoterminową preparatu, jak również na jego przedłużone działanie w stosunku do układu immunologicznego przeżuwaczy. Na podstawie cytowanego doświadczenia potwierdzono, że ekstrakt *Echinacea purpurea* może być stosowany w leczeniu subklinicznej postaci *mastitis* u przeżuwaczy. Odmienne wyniki uzyskano w badaniach własnych. W trakcie prezentowanego eksperymentu w mleku siedmiu sztuk krów wykazano wzrost poziomu liczby komórek soma tycznych, co stanowiło 31,8% grupy chorych krów. Prawdopodobnie był to efekt wystąpienia oporności bakterii na zastosowany preparat. Coraz częściej można się spotkać ze szczepami wieloopornymi, które są efektem nadużywania i nieprawidłowego stosowania antybiotyków i chemioterapeutyków w żywieniu, leczeniu i prewencji u przeżuwaczy [10].

Ze względu na to, że *mastitis* jest głównym źródłem występowania w mleku drobnoustrojów patogennych i toksyn szkodliwych zarówno dla

zwierząt, jak i dla człowieka przeprowadzono ich identyfikację. Dane pochodzące z literatury wskazują, że różnorodność występujących patogenów zależy od bardzo wielu czynników: wielkości stada, kwalifikacji i sumienności personelu oraz zarządzania stadem, w tym decyzji brakowania krów chorych przewlekle. Istotnym czynnikiem ograniczającym przypadki *mastitis* jest w dużej mierze karmienie krów bezpośrednio po doju jak i stosowanie ręczników i rękawiczek jednorazowych podczas doju [11]. Natomiast nadużywanie lub niewłaściwe stosowanie antybiotyków może prowadzić do występowania oporności różnych szczepów bakterii.

Określona w badaniach własnych ogólna liczba bakterii (OLB) w mleku, w tym poziom bakterii katalazo-ujemnych, katalazo-dodatnich, laktozo-dodatnich, laktozo-ujemnych oraz hemolizujących wskazuje wyraźnie, że ponadnormatywny poziom LKS uwarunkowany był stanem zapalnym wymienia (tab. 1).

Tab 1. Liczba komórek somatycznych (LKS) i ogólna liczba bakterii (OLB) mleka przed i w trakcie stosowania preparatu *Echinacea purpurea* u badanych krów [tys/cm³]

| Krowa | Poziom wyjściowy | | Po 7 dniach aplikacji | | Po 14 dniach aplikacji | |
|-------|------------------|------|-----------------------|------|------------------------|------|
| | LKS | OLB | LKS | OLB | LKS | OLB |
| 1 | 2065 | 203 | 4522 | 354 | 9783 | 175 |
| 2 | 8086 | 810 | 3470 | 196 | 3305 | 170 |
| 3 | 308 | 11,8 | 125 | 13 | 91 | 15,4 |
| 4 | 1965 | 657 | 1681 | 533 | 520 | 108 |
| 5 | 297 | 36,6 | 121 | 54,4 | 106 | 50,8 |
| 6 | 130 | 15 | 191 | 36,6 | 151 | 41,9 |
| 7 | 1734 | 203 | 9999 | 220 | 183 | 54,5 |
| 8 | 1635 | 220 | 1599 | 205 | 450 | 130 |
| 9 | 3482 | 195 | 855 | 185 | 476 | 41,1 |
| 10 | 1953 | 528 | 1371 | 240 | 1339 | 132 |
| 11 | 1185 | 337 | 965 | 185 | 1331 | 122 |
| 12 | 1182 | 223 | 827 | 125 | 651 | 74,4 |
| 13 | 2224 | 256 | 979 | 308 | 2046 | 595 |
| 14 | 676 | 33,7 | 395 | 35 | 331 | 51,2 |
| 15 | 79 | 8,1 | 184 | 52 | 138 | 51,6 |
| 16 | 574 | 61,8 | 552 | 56,5 | 590 | 55,7 |
| 17 | 525 | 32,1 | 456 | 105 | 269 | 41,1 |
| 18 | 643 | 171 | 1008 | 175 | 519 | 52 |
| 19 | 488 | 157 | 856 | 155 | 919 | 182 |
| 20 | 321 | 51,2 | 265 | 40,7 | 198 | 35,8 |

Źródło: Opracowanie własne

W tabeli 2. przedstawiono częstotliwość występowania różnych drobnoustrojów wyizolowanych z próbek mleka z podwyższoną LKS, czyli

powodujących subkliniczne postaci zapalenia gruczołu mlekowego u krów w trakcie eksperymentu.

Według Kłossowskiej i wsp. [12], zapalenia wymion mogą wywoływać drobnoustroje należące do 137 gatunków, jednakże w zależności od patogenu mogą dawać różny obraz. Dlatego też infekcje wywołane m.in.: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, – bakterie należące do pierwszej grupy patogenności wpływają na istotne podwyższenie poziomu komórek somatycznych. Zapalenie wywołane przez bakterie należące do drugiej grupy patogenności m.in.: *Corynebacterium bovis*, koagulazoujemne gronkowce zobrazowane są przez niewielkie podwyższenie poziomu LKS w mleku [13].

Tabela 2. Procentowa obecność drobnoustrojów zidentyfikowanych w próbkach mleka od badanych krów

| Właściwości fenotypowe bakterii | % zaobserwowanych przypadków | Prawdopodobna obecność drobnoustrojów z rodzaju |
|--|------------------------------|---|
| katalazo dodatnie ogółem | 18,1% | Staphylococcus |
| katalazo-ujemne ogółem | 81,9% | Streptococcus, Enterococcus lub Clostridium |
| Wykorzystujące zlizowaną krew ogółem | 9,1% | Haemophilus |
| Bakterie gram ujemne laktozo-dodatnie ogółem | 54,5% | Escherichia (E. coli), Klebsiella |
| Bakterie gram ujemne laktozo-ujemne ogółem | 45,5% | Salmonella, Shigella |
| Wytwarzające hemolizyny ogółem | 77,2 | |
| α -hemoliza | 11,0% | Streptococcus |
| β -hemoliza | 55,0% | Staphylococcus, Streptococcus |
| oba typy hemoliz | 27,0% | Zakażenia obydwoma rodzajami bakterii |

Źródło: Opracowanie własne

Lassa i wsp. [14] wykazali, że paciorkowce reprezentowały najliczniejszą grupę drobnoustrojów wywołujących kliniczne postaci. Częstotliwość występowania gronkowców była niemal o połowę niższa i wynosiła prawie 18%, z czego gronkowce złociste (*Staphylococcus aureus*) stanowiły 22,9%. W przeanalizowanym pod względem mikrobie-

logicznym materiale biologicznym bakterie katalazo-ujemne stanowiły 81,9%, a bakterie katalazo-dodatnie stanowiły 18,1% badanych próbek. Bakterie rosnące na podłożu ze zlizowaną krwią stanowiły 9,09% badanych próbek. Wśród puli bakterii G (-) bakterie laktozo-dodatnie stanowiły 54,5% próbek, a laktozo-ujemne 45,5%. W badaniach Lassa i wsp. [14] pałeczki Gram (-) izolowano w 16,4% przypadkach, z czego *Escherichia coli* była przyczyną 30,8% przypadków *mastitis*. Natomiast w badaniach Shpigel i wsp. [15], pałeczki stanowiły 53,3% wszystkich badanych próbek.

W próbkach mleka oprócz *E. coli* (54,5% przypadków) izolowano gatunki drobnoustrojów z rodzajów *Enterobacter* oraz *Klebsiella* (81,9% przypadków). Malinowski i Gajewski [16] podają, że do zakażeń na drodze galaktogennej dochodzi na początku i pod koniec okresu zasuszenia, natomiast w pierwszych 6. tygodniach laktacji obserwuje się najwięcej przypadków *colimastitis*. Ostre postaci, jak i przewlekłe i podkliniczne *colimastitis* występują głównie w okresie letnim, kiedy dodatkowo krowy ulegają wpływowi stresu termicznego i są narażone na wzmożone ataki insektów.

W badaniach własnych bakterie wytwarzające hemolizyny stanowiły 77,2% wszystkich badanych próbek, z tego α -hemolizę zaobserwowano w 11% przypadków, β -hemolizę w 55%, a oba typy hemolizy w 27% przypadków. Liczne zakażenia w badanym stadzie wywołane były przez bakterie zarówno środowiskowe, jak i patogenne. Przy tak dużym zróżnicowaniu zakażeń bakteryjnych, subkliniczne przypadki zapalenia wymion u badanych krów ze względu na charakterystyczny ostry przebieg i wysokie temperatury w miesiącu sierpniu oraz ataki much zdiagnozowano jako "*colimastitis*".

Na podstawie przeprowadzonego doświadczenia potwierdzono, że ekstrakt *Echinacea purpurea* może być stosowany w leczeniu subklinicznej postaci *mastitis* u krów użytkowanych mlecznie w gospodarstwach certyfikowanych. Pozytywna odpowiedź immunosupresyjna organizmu krowy w stosunku do zastosowanego preparatu prawdopodobnie była efektem obecności jednego z bioaktywnych składników, których bogatym źródłem jest jeżówka purpurowa, należących do: izobutyloamidów, alkiloamidów, polienów, poliacetylenów, polifenoli i licznych pochodnych kwasu kawowego (kwas chlorogenowy, izochlorogenowy, kwas Cychrynowy, echinakozyd, werbakozyd), flawonoidów (luteolina, kwercetyna, apigenina), kwasów: cytrynowego, winowego, askorbinowego, a także całej gamy polisacharydów: 4-0-metyloglukurono-arabinoksylany, ksyloglukany, arabinoramnogalaktyany, arabionogalaktyany – lub ich synergicznego działania. Najważniejsze działanie immunostymulujące jeżówki wynika z obecności pochodnych kwasu kawowego. Pochodna kwasu kawowego jak wykazano, stymuluje aktywność komórek odpornoś-

ciowych, wykazuje działanie przeciwwirusowe i jest silnym przeciwutleniaczem, hamuje działanie enzymów hialuronidazy, które wpływają na zakażenie i stan zapalny. Natomiast polisacharydy stymulują aktywność komórek układu immunologicznego, a także wykazują aktywność przeciwzapalną [4]. Ziele jeżówki bogate jest w związki takie jak: glikozydy, flawonoidy, olejek eteryczny, poliacetyleny, alkaloidy pirolizydynowe. Inaczej rzecz się ma z ekstraktem korzeń *Echinaceae* bogaty jest w glikozyd fenolowy, kwas chlorogenowy, kwas izo-chlorogenowy, dodatkowo zawiera inulinę (ok. 4-6%), cynarynę, glikoproteiny, poliacetyleny, alkaloidy pirolizydynowe, związki aminowe i inne [16].

Środki ziołowe stanowią doskonałą alternatywę dla antybiotyków, niezaprzeczalnym ich atutem jest bogactwo naturalnych bioaktywnych składników (często o właściwościach immunosupresyjnych), nie powodujących antybiootykooporności, jak również są znacznie tańsze. Dodatkowo, należy podkreślić, że systematyczne ich stosowanie przynosi porównywalne, a niekiedy nawet lepsze efekty niż powszechnie stosowane na dużą skalę leki alopacyjne.

5. Podsumowanie i wnioski

W badanym stadzie gruczoły mlekowe z *mastitis* zakażone były bakteriami zarówno patogennymi, jak i środowiskowymi, dominowały patogeny fenotypowo zidentyfikowane jako katalazo ujemne.

Ekstrakt z *Echinacea purpurea* zastosowany w typie aplikacji maść okazał się skuteczny w inhibicji drobnoustrojów wywołujących *mastitis* i leczeniu jego subklinicznego stanu.

Poprawę jakości higienicznej mleka zaobserwowano zarówno po pierwszym, jak i drugim tygodniu aplikowania maści odpowiednio w 70% i 65% przypadków chorych krów.

Literatura

1. Tyburski J., Żakowska-Biemans S. *Wprowadzenie do rolnictwa ekologicznego*. Wydawnictwo SGGW, Warszawa (2007), s 103-132
2. Herbut E., Walczak J. *Polska produkcja zwierzęca a Wspólna Polityka Rolna*. Wiadomości Zootechniczne (2015), R. LIII, 4, s. 109-120
3. Reklewska B., Bernatowicz E., Ryniewicz Z., Rua Pinto R., Zdziarski K. *Preliminary observations on the Echinacea-induced lactoferrin production in goat milk*. Animal Science Papers and Reports (2004), vol. 22, no 1, s. 17-25
4. Teleb D.F., El-Saied U.M., Sallam A.A., El-Baz A.M., Hussein A.M. *Effect of using Echinacea extract as immune-stimulating additive on milk yield traits, immunity and udder health of Zaraibi Goats*, Egyptian Journal of Sheep & Goat Sciences (2009), vol. 4, no. 2, s. 33-53

5. Litwińczuk Z., Król J., Brodziak A., Barłowska J. *Changes of protein content and its fraction in bovine milk from different breeds subject to somatic cell count*, Journal of dairy Science (2011), 94, s. 684-691
6. Kuczyńska B., Puppel K. *Ocena jakości mleka. Metody chowu i hodowli bydła* (2011) wydawnictwo SGGW, s. 109-133
7. PN-A- 86002 (1999) Badanie mleka surowego
8. Schepers A.J., Lam T.J., Schukken Y.H., Hanekamp W.J, Estimation of variance components for somatic cell counts to determine threshold for uninfected quarters. J. Dairy Sci. (1996), 80, s. 1833-1840
9. Harmon R, Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. J. Dairy Sci. (1994), 77, s. 2103-2107
10. Kaba J., Bagnicka E., Nowicki M., Rzewuska M., Nowicka D., Witkowski L., Sobczak-Filipiak M., Osińska B., Sendecka H., Czopowicz M., Szałaś-Jordanow O, *Zapalenie wymienia u kóz – najczęstsze przyczyny i rozpoznawanie*. Życie Weterynaryjne (2009), 84, (8), s 637-643
11. Plozza K., Lievaart J.J., Potts G., Barkema H.W, *Subclinical mastitis and associated risk factors on dairy farms in New South Wales*. Australian Veterinary Journal (2011), s 41-46
12. Kłossowska A., Malinowski E., Kuźma K, Zależność liczby komórek somatycznych w mleku zatokowym krów z mastitis od bakteryjnego czynnika etiologicznego. Med. Wet., (2005), 61: 53-58
13. Malinowski E., Kłossowska A. *Komórki somatyczne mleka*. Med. Wet., (2001), 57: 13-20
14. Lassa H., Kubiak J., Małkińska-Horodyska M, Bakterie najczęściej izolowane z klinicznych postaci mastitis u krów oraz ich wrażliwość na antybiotyki. Życie Weterynaryjne, (2013), 88, (8), s. 651-653
15. Shpigel N.Y., Winkler M., Ziv G., Saran A, Clinical, bacteriological and epidemiological aspects of clinical mastitis in Israeli dairy herds. Prev. Vet. Med. (1998), 35, 1-9.
16. Malinowski E., Gajewski Z, Charakterystyka zapaleń gruczołu mlekowego u krów wywołanych przez odżywnościowe patogeny człowieka. Życie Weterynaryjne (2009), 84, 4, 290-294
17. Segiet-Kujawa E., Mścisz A, *Jeżówka (Echinacea)- Nowoczesny Immunokosmetyk*. Wiadomości Zielarskie (2000), s 3

Próba zastosowania ekstraktu z *Echinacea purpurea* w zwalczaniu bakterii patogennych wywołujących mastitis u krów

Streszczenie

Zastosowanie ekstraktu z jeżówki purpurowej może stać się alternatywą do stosowania antybiotyków w zwalczaniu i leczeniu mastitis, szczególnie w gospodarstwach ekologicznych. Badaniami objęto 20 krów z podejrzeniem stanu subklinicznego i przewlekłego mastitis wyselekcjonowane z gospodarstwa ekologicznego specjalizującego się w produkcji mleka - na podstawie wcześniejszych obserwacji oraz oznaczenia liczby komórek somatycznych (LKS) i ogólnej liczby bakterii (OLB) w próbkach mleka. W eksperymencie trwającym 2 tygodnie zastosowano ekstrakt z jeżówki purpurowej w postaci maści stosowanej po doju bezpośrednio na wymiona. W próbkach mleka oznaczano jakość mikrobiologiczną i cytologiczną w interwałach co tygodniowych. Po 7. dniach stosowania preparatu odnotowano obniżenie w badanych próbkach mleka poziomu OLB i LKS odpowiednio o 21,7% i 70,0%, a po 14. dniach o 30,4% i 65,0%. Po zakończeniu dozowania maści łącznie wykazano poprawę u 50% krów biorących udział w doświadczeniu. W trakcie eksperymentu zidentyfikowano zakażenia próbek mleka bakteriami patogennymi, głównie streptococci.

Słowa kluczowe: mastitis u krów, identyfikacja patogenów, jeżówka purpurowa

The attempt to apply of *Echinacea purpurea* extract in combating pathogenic bacteria causing cow's mastitis

Abstract

The use of an extract of *Echinacea* can be an alternative for antibiotics in destroying and treatment of mastitis. Study included 22 cows selected from a flock specializes in the production of milk on the basis of the preliminary determination somatic cell count (SCC) and the total bacteria count (TBC). In the two weeks experiment applied *Echinacea* extract in the form of unguent applied directly after milking the udder. The milk samples were determined in cytological and microbiological quality. In the test samples of milk there was a decline of TBC and SCC, respectively in 70,0%, and 21,7% after seven days of treatment and in about 30,4% and 65,0% after fourteen days of treatment. After finish dosing the ointments the improvements were shown in 50% of cows which involved in the experiment. Milk samples were identified as infected of bacterial, mainly *Streptococcus*.

Keyword: bovine mastitis, bacterial isolate

Tymianek pospolity **– wartościowa roślina przyprawowa,** **lecnicza i olejkodajna. Praca przeglądowa**

1. Wprowadzenie

Od najdawniejszych czasów podstawowe źródło leków stanowiły rośliny lecznicze, a wiedza o ich zastosowaniu i działaniu była przekazywana kolejnym pokoleniom. Polska sztuka leczenia roślinami wzięła swój początek ze średniowiecznego ziołarstwa, a z czasem rozwinęła się w nowoczesną metodę leczenia, zwaną fitoterapią [1, 2]. Obecnie obserwuje się wzrost zainteresowania lekami roślinnymi, które mogą być alternatywą wobec leków syntetycznych. Wiele gatunków roślin zielarskich znalazło zastosowanie również jako przyprawy, a ich właściwości aromatyczne oraz lecznicze wpływają korzystnie na proces trawienia i przyswajania składników pokarmowych. Celem niniejszej pracy jest przedstawienie gatunku tymianku pospolity (*Thymus vulgaris* L.), jako jednej z wartościowych roślin leczniczych stosowany nie tylko jako przyprawę, ale także jako środek leczniczy, aromatyczny i kosmetyczny [3, 4]. Łacińska nazwa tymianku pochodzi z greckiego słowa *thyo* oznaczającego „perfumy, przyjemną woń” lub *thymos* słowa znaczącego „odwaga i wytrzymałość” [5]. W starożytnej Grecji tymianek opisywał już Hipokrates (V/IV w. p.n.e.) w dziele *Corpus Hippocraticum*, uważając go za lek moczopędny. Teofrast z Eresos (IV/III w. p.n.e.) wykazywał lecznicze działanie olejków eterycznych w dziele *Co się tyczy zapachów* [6]. Wzmianki o tymianku znaleźć także można w dziełach rzymskich uczonych, gdzie figuruje pod nazwą *thymo* u Dioskurydesa (I w. n.e.) czy Galenusa (I/II w. n.e.) [5].

2. Systematyka, pochodzenie, biologia

Tymianek pospolity (*Thymus vulgaris* L.) należy do rodziny jasnotowatych (Lamiaceae). Pochodzi z rejonu Morza Śródziemnego, głównie terenów Hiszpanii, południowej Francji i Włoch oraz północnej Afryki [5]. Jego duże zdolności adaptacyjne do warunków środowiskowych sprawiły,

¹ natalia.skubij@gardenc.pl, Katedra Uprawy i Nawożenia Roślin Ogrodniczych, Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, www.up.lublin.pl

iż uprawiany jest na terenach o klimacie umiarkowanym całego świata. Tymianek pospolity do Europy Środkowej i Anglii dotarł około XI wieku. Do Polski sprowadzony został za czasów królowej Bony (od XVI w.), za pośrednictwem zakonników włoskich. Początkowo uprawiany był w ogrodach przyklasztornych i przyaptecznych, z czasem wprowadzony do ogródków przydomowych [7]. Obecnie jego uprawa zajmuje kilkaset hektarów zlokalizowanych na terenie niemal całego kraju.

Tymianek pospolity znany jest też pod nazwą macierzanka tymianek, tymianek ogrodowy. Jest to wiecznie zielona krzewinka o wysokości 20-40 cm. Łodygi ma prosto wzniesione lub częściowo pokładające, rozgałęzione, u nasady drewniejące. Roślina tworzy liście jajowate, krótkoogonkowe, szarozielone, od spodu kutnerowo owłosione, długości do 1,2 cm, ułożone naprzeciwległe. Tymianek kwitnie od maja do września. Kwiaty ma dwuwargowe, drobne, różowe lub fioletowe, zebrane w główkowate kwiatostany na szczytach pędów. Kwiat tymianku obficie nektarują i są chętnie odwiedzane przez pszczoły miodne. Owocem tego gatunku jest poczwórna rozłupnia, zawierająca jasnobrunatne rozłupki. Roślina odznacza się silnym, tymolowym zapachem [8].

Thymus vulgaris L. jest jedną z najważniejszych roślin leczniczych Europy, uprawianą w wielu regionach świata. Plantacje tymianku zazwyczaj zakładane są w dwu- lub trzyletnim cyklu uprawy, jednakże w niektórych regionach podczas chłodnych zim rośliny mogą wymarzać. Dlatego w krajach, gdzie zimy są mroźne (Skandynawja, Europa Wschodnia, Kanada) tymianek jest uprawiany w cyklu rocznym [9, 10, 11]. W uprawach europejskich wyróżnia się dwie formy tymianku: *Thymus vulgaris* L. f. *capitatus* Willk. et Lange, tzw. francuski, jednoroczny, mało odporny na chłody oraz *Thymus vulgaris* L. f. *vercillatus* Willk. et Lange, tzw. niemiecki, wieloletni [12].

3. Uprawa tymianku – wymagania, wpływ na jakość surowca

Tymianek najczęściej uprawiany jest po przez wysiew nasion wprost do gruntu. Na glebach zaskorupiających się np. lessowych korzystniejsze jest jednak zakładanie plantacji po uprzednim wyprodukowaniu rozsady np. w tunelu foliowym [13]. W uprawie tymianek wymaga stanowiska słonecznego, osłoniętego od wiatru, o glebie przepuszczalnej, o dobrej strukturze, zasobnej w wapń. Tymianek jest rośliną wrażliwą na zachwaszczenie zwłaszcza podczas wschodów. Wyższy plon ziela *Thymus vulgaris* L. o lepszych walorach jakościowych przy skutecznej redukcji ilościowych wskaźników zachwaszczenia zapewnia mechaniczno-chemiczna pielęgnacja ładu oraz uprawa na stanowisku po roślinach okopowych [14]. Tymianek ma małe wymagania wodne. Na wielkość

plonusurowca silnie wpływają opady w kwietniu i maju, które warunkują właściwe wschody nasion i początkowy wzrost roślin. Wyższe plony odnotowuje się, gdy suma opadów w tym okresie mieści się w zakresie 125-175 mm [15]. Natomiast wyższe średnie temperatury powietrza w okresie wegetacji zmniejszają procentową zawartość olejku w ziele. Według Czekanowskiego i in. [15] optimum termiczne dla tymianku mieści się w przedziale od 14,2 °C do 14,7 °C, [15] zaś Seidler-Łożykowska [16] podaje szerszy zakres lub od 14,2 °C do 16,8°C. Stosowanie dodatkowego nawadniania na plantacjach tymianku poza istotnym wpływem na wysokość plonów, modyfikuje także ich jakość [17, 18]. Istotnymi czynnikami wpływającymi na wzrost i rozwój tymianku są rodzaj i właściwości fizyczne gleby oraz jej zasobność w składniki pokarmowe. Dostępność takich makroelementów jak azot, fosfor i potas jest ważne dla *Thymus vulgaris* L. gdyż wpływa na biosyntezę olejku eterycznego zwłaszcza zawartość tymolu i karwakrolu [19]. Stosowanie wzrastających dawek azotu zwiększa plon świeżego i suchego zieleń oraz koncentrację olejku eterycznego [20, 21]. Zarówno po aplikacji azotu roślinie dogłębowo jak i dolistnie odnotowano wzrost kumulacji tymolu oraz spadek zawartości p-cymenu i karwakrolu [22]. Zastosowanie odpowiedniego nawożenia NPK przyczynia się do wzrostu ilościowego i jakościowego surowca tymianku [23, 24].

Innym czynnikiem modyfikującym wielkość i jakość plonu tymianku jest termin zbioru. Koncentracja olejku eterycznego istotnie zmniejsza się w kolejnych zbiorach. Jego zawartość wynosi od 3,40 do 2,73% u odmiany tymianku 'Słoneczko' oraz 3,48 do 2,61% u odmiany 'Deutscher Winter' [25]. Termin zbioru surowca w celu uzyskania najwyższego plonu świeżej i suchej masy jest uzależniony od warunków klimatycznych uprawy, może trwać od 115 dni od siewu [26] lub 180 dni od siewu [25].

4. Skład chemiczny surowca i jego zróżnicowanie

Surowcem farmakopealnym tymianku pospolitego jest ziele (*Thymiherba*). Są to ulistnione wierzchołki pędów, zbierane na początku kwitnienia roślin, suszone w warunkach naturalnych lub w suszarni w temperaturze 35°C [8].

Głównym składnikiem surowca jest olejek eteryczny (*Thymiaetheroleum*), będący bezbarwną, czerwona lub żółta, rzadką cieczą o charakterystycznym ziołowym zapachu trzymywaną podczas destylacji z parą wodną wodnej zawiesiny rozdrobnionego kwitnącego zieleń [31]. Zwykle zawartość olejku w świeżym surowcu nieprzekracza 1% jego masy [31], a w jego suszu może stanowić od 0,32% [32] do 4,9% [33].

Tymianek pospolity wykazuje dużą zmienność składu chemicznego olejku. W obrębie tego gatunku znanych jest kilka chemotypów, jednakże najcenniejszy jest chemotyp tymolowy, którego olejek zawiera znaczny udział tymolu (20-83%). Ważnymi składnikami tego olejku są również: karwakrol (0,5-6%), p-cymen (9-43%), α -pinen (0,5-3%), linalol (0-21%), borneol (0-5%), 1,8-cyneol (0-2,5%), geraniol (0-6%), jak również β -kariofilen (0,6-3,6%), limonen (2,0-82,3%), γ -terpinen (0,4-8,3%), terpinen-4-ol (0,2-11,0%) oraz trans-sabinen uwodniony (0-18,2%) [34, 35].

Skład chemiczny olejku eterycznego tymianku może być zróżnicowany, co wynika ze zmienności genetycznej, ontogenetycznej [27, 28] i środowiskowej [29, 30]. Porównując skład chemiczny olejku tymiankowego pozyskiwanego z różnych regionów Raal i in. (2005) stwierdzili duże zróżnicowanie w obrębie omawianego gatunku. Zawartość tymolu była najwyższa w olejkach pozyskiwanych z tymianku pochodzącego z Holandii (65,5%) i Estonii (75,7%), natomiast u roślin uprawianych w Grecji dominował karwakrol (83,5%). Olejek pozyskiwany z tymianku rosnącego w Armenii zawierał 17% tymolu oraz wysoką zawartością neralu i citronelolu (32,5%). W krajach takich jak Szkocja, Francja, Mołdawia czy Rosja w składzie olejku eterycznego przeważał tymol i p-cymen [29]. Dane te wykazują, że biosynteza olejku eterycznego u tymianku pozostaje pod wyraźnym wpływem czynników genetycznych związanych z tworzącymi się rasami chemicznymi gatunku, w obrębie zasiedlonego terytorium, ale podlega także oddziaływaniu czynników środowiska danego regionu.

Analizując skład chemicznych olejków *Thymus vulgaris* L. dostępnych w literaturze [36-39] wyróżnić można kilka chemotypów tego gatunku: 1. olejki bogate w tymol (z podgrup tymolu > p-cymen > γ -terpinen; p-cymen > tymol > γ -terpinen i p-cymen > γ -terpinen > tymol), 2. olejki bogate w karwakrol zbierane głównie z Francji, Włoch i Kanady, 3. olejki bogate w karwakrol /tymolu (z podgrup karwakrol > tymol i tymol > karwakrol), 4. olejki bogate w linalol znalezione w Egipcie 5. olejki bogate w geraniol, 6. olejki bogate w γ -terpineol, 7. olejki bogate w trans-sabinenu uwodniony / terpinen-4-olu z Francji.

Ziele tymianku jest zasobne także w inne substancje biologicznie aktywne, takie jak flawonoidy, garbniki, kwasy fenolowe, związki triterpenowe, gorycze, saponiny, cukry, witaminy i związki mineralne [22].

5. Aktywność farmakologiczna

Substancje czynne ziela tymianku działają aktywnie na układ trawienny, pobudzają wydzielanie soku żołądkowego, zwiększają apetyt, przyspieszają trawienie i przyswajanie składników pokarmowych. Tymianek należy do najstarszych ziół świata, a jego znaczenie w sztuce kulinarnej dorównuje

znaczeniu w medycynie. Jest jedną z najczęściej używanych roślin przyprawowych, a jego aromatyczne świeże lub po wysuszeniu ziele stosowane jest jak dodatek do wielu potraw. Szczególnie kuchnie włoska, francuska i hiszpańska swój specyficzny charakter zawdzięczają zapachowi tymianku [4]. Olejek eteryczny oraz ekstrakty z ziele *Thymus vulgaris* L. Wykazują wielokierunkowe działanie na organizm człowieka. Posiadają właściwości przeciwbakteryjne, zarówno w stosunku do bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych [40] oraz przeciwgrzybicze [41]. Ziele w leczeniu często jest wykorzystywane jako środek wykrztuśny [42]. Stwierdzono, że pobudza wydzielanie śluzu i ruch rzęsek nabłonka górnych dróg oddechowych. Przyczynia się do rozrzedzenia zalegającej wydzieliny i ułatwia jej odkrztuszenie. Ponadto łagodzi napady kaszlu [43]. Inhalacje z olejku tymiankowego stosowane są w leczeniu uporczywych zakażeń dróg oddechowych. Tymianek pospolity posiada także działanie spazmolityczne. Obecne w nim związki gorzkie pobudzają wydzielanie soku żółciowego, przyspieszają trawienie i ułatwiają przyswajanie pokarmów. *Thymi aetheroleum* wskazany jest jako środek ochrony przeciwko bakteriom wywołującym schorzenia układu pokarmowego [44]. Ponadto tymianek wykazuje również działanie wiatropędne, żółciopędne, uspokajające i diuretyczne [1, 2]. Badania wykazały też korzystne działanie olejku tymiankowego na gojenie ran po oparzeniach [4].

Ziele tymianku ze względu na właściwości konserwujące i antyoksydacyjne stosowane jest również do konserwacji żywności oraz produkcji win ziołowych i likierów [2]. Ze względu na działanie bakteriobójcze, olejek tymiankowy jest używany jako składnik past do zębów, płynów do płukania ust i gardła, kosmetyków stosowanych po goleniu, dezynfekujących kremów i płynów oraz jako składnik dodatków do kąpieli oraz maseczek kosmetycznych [31]. Wstępne badania Lakis i in. (2012) wskazują na możliwość zastosowania olejków *Thymus vulgaris* L. Zawierającego tymol i karwakrol, jako składników preparatów antyseptycznych stosowanych w jamie ustnej [45]. Olejek tymiankowy okazał się skutecznym środkiem przeciwbakteryjnym w odniesieniu do szczepu *Enterococcus faecalis* opornego na działanie wankomycyny, co wskazuje na możliwość jego zastosowania w terapii naturalnej chorób infekcyjnych [46]. W badaniach Kaziem i in. [47], olejek eteryczny tymianku wywołał silniejszy efekt bakteriobójczy niż streptomycyna.

6. Podsumowanie

Tymianek pospolity jest bardzo cenną rośliną leczniczą i aromatyczną, a jej aktywność związana jest głównie z obecnością olejku eterycznego i zawartych w nim związków fenolowych – tymolu i karwakrolu. Olejek

eteryczny, z uwagi na wysoką aktywność przeciwbakteryjną i przeciwutleniającą, może być stosowany w celach medycznych, kosmetycznych, a także jako środek do konserwacji żywności. Skład chemiczny olejku tymianku pospolitego, a zwłaszcza obecność składników dominujących, ulegają zmianom pod wpływem czynników genetycznych, ontogenetycznych i środowiskowych oraz uprawowych. W medycynie szerokie zastosowanie mają ekstrakty z surowca tymianku oraz olejek eteryczny używany w aromaterapii, do masażu, kąpieli i inhalacji. Tymianek stosuje się jako lek wykrztuśny, spazmolityczny, żółciopędny i żółciotwórczy oraz pobudzający czynności żołądka i wydzielanie soków trawiennych. Preparaty z tymianku oraz olejek tymiankowy należą do popularnych leków naturalnych, są skuteczne, bezpieczne, a ich stosowanie ma długoletnią tradycję.

Literatura

1. Lutomski J. *Ziola, fito farmaceutyki i nutraceutyki*, Postępowanie Fitoterapii, 1 (2000), s. 4-6
2. Lutomski J. *Znaczenie ziół w terapii i dietetyce*, Herba Polonica, 48 (4) (2002), s. 300-310
3. Jambor J. *Kierunki rozwoju krajowego rynku surowców i przetworów zielarskich*, Wiadomości Zielarskie, 10 (2001), s. 1-7
4. Kluszczyńska M. *Lecznicze właściwości tymianku*, Wiadomości Zielarskie, 8 (2001), s. 13-16
5. Morales R. *Medicinal and Aromatic Plants – Industrial Profiles, vol. 24- Thyme*, pod redakcją E. Stahl-Biskup and F. Saez, Taylor&Francis, (2002)
6. Nartowska J. *Tymianek -leczy i smakuje*, Panacea, 2(47) (2014), s. 5-7
7. Kulesza P. *Ogrody lecznicze na wybranych dziełach malarstwa tablicowego XV wieku*, Architektura, 30 (2012), s. 50-53
8. Zawisłak G. *Poradnik dla plantatorów Uprawa ziół: Tymianek pospolity*, pod redakcją B. Kołodziej, PWRIL, (2010), s. 422-425
9. Dambrauskienė E., Viskelis P., Venskutonis R. *Effect of nitrogen fertilizers on the yield of first year thyme and its quality*, Scientific Works, 18 (1999), s. 107-112
10. Letchamo, W., Gosselin A., Hoelzl J., Marquard R. *The selection of Thymus vulgaris cultivars to grow in Canada*, Journal of Essential Oil Research, 11(3) (1999), s. 337-342
11. Galambosi, B., Galambosi Z.S., Pessala R., Hupila I., Aflatuni A., Svoboda P.K., Repcak M. *Yield and quality of selected herb cultivars in Finland*, Acta Horticulturae, 576 (2002), s. 139-149
12. Dzida K. *Plon oraz wartość biologiczna ziela tymianku pospolitego (Thymus vulgaris L.) i cząbku ogrodowego (Satureia hortensis L.) w zależności od żywienia azotem i potasem*, Rozprawa Naukowa, WUP Lublin, 379(2013)
13. Kołodziej B. *Wpływ sposobu zakładania plantacji i nawożenia dolistnego na plon i jakość tymianku pospolitego*, Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska, Sectio EAgricultura, LXIV(2) (2009), s. 1-7
14. Kwiatkowski C., Kołodziej B. *Wpływ przedplonu i sposobu pielęgnacji na zachwaszczenie łąny i jakość surowca tymianku właściwego (Thymus vulgaris)*

- L.), AnnalesUniversitatisMariaeCurie-Skłodowska, Sectio E Agricultura, LX (2005), s. 175-184
15. Rzekanowski C., Marynowska K., Rolbiecki S., Rolbiecki R. *Oddziaływanie wybranych czynników meteorologicznych na niektóre elementy plonu czterech gatunków ziół uprawianych w warunkach deszczowania*, Acta Agrophysica, 12(1)(2008) s. 163-171
 16. Seidler-Łożykowska K. *Wpływ warunków pogodowych na zawartość olejku eterycznego w surowcach tymianku właściwego (Thymus vulgaris L.) i majeranku ogrodowego (Origanum majorana L.)*, Roczniki Akademii Rolniczej w Poznaniu. CCCLXXXIII, Ogrodnictwo, 41 (2007), s. 605-608
 17. Kołodziej B. *Wpływ nawadniania i typu gleby na plonowanie i jakość surowca tymianku właściwego (Thymus vulgaris L.)*, Roczniki Akademii Rolniczej w Poznaniu. CCCLXXX, Rolnictwo, 66 (2006), s. 145-151
 18. Berbeć S., Kołodziej B. *The effects of herbs irrigation*, Herba Polonica., 53(3) (2007), s. 141-145
 19. Sell, C.S. 2003. *A Fragrant Introduction to Terpenoid Chemistry*. The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Science Park, Milton Road, (2003), s. 410
 20. Baranauskienė R., Venskutonis P.R., Viskelis P., Dambrauskienė E. *Influence of nitrogen fertilizers on the yield and composition of thyme (Thymus vulgaris)*, Journal of Agricultural and food chemistry, 51 (2003), 7751-7758
 21. Vakili M., Sharafzadeh S. *Growth and volatile oil yield of garden thyme as affected by nitrogen source and level*, Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences, 4(1) (2014), s. 205-208
 22. Jabbari R., Dehaghi M.A., Sanami A.M., Agami K. *Nitrogen and iron fertilization methods affecting essential oil and chemical composition of thyme (Thymus vulgaris L.) medicinal plants*, Advances in Environmental Biology, 5(2) (2011), s. 433-438
 23. Sharafzadeh S. *Effect nitrogen, phosphorous and potassium on growth, essential oil and total phenolic content of garden thyme (Thymus vulgaris L.)*, Advances in Environmental Biology, 5(4) (2011), s. 699-703
 24. Kozera W., Majcherczak E., Barczak B., Knapowski T., Wszelaczyńska E., Pobereźny J. *Response of the yield and mineral composition of garden thyme (Thymus vulgaris L.) herbage to various NPK proportions*, Journal of Elementology, 20(4) (2015), s. 921-931
 25. Król B., Kiełtyka-Dadasiewicz A. *Yield and herb quality of thyme (Thymus vulgaris L.) depending on harvest time*, Turkish Journal of Field Crops, 20(1) (2015), s. 78-84
 26. Chauhan N.K., Singh S., Lohani H., Heider Z.S. *Effect of different harvesting time on growth, yield and quality of thyme under the agro-climatic conditions of Doon Valley, Uttarakhand*, Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 3 (6) (2011), s. 982-986
 27. Christensen L.P., Grevsen K. *Effect of development stage at harvest on the composition and yield of essential oils from thyme and oregano*, Developments in Food Science, 43 (2006), s. 261-264
 28. Mewes S., Krüger H., Pank F. *Physiological, morphological, chemical and genomic diversities of different origins of thyme (Thymus vulgaris L.)*, Genetic Resources and Crop Evolution, 55(8) (2008), s. 1303-1311
 29. Raal A., Arak E., Orav A. *Comparative chemical composition of the essential oil of Thymus vulgaris L. from different geographical sources*, Herba Polonica, 1(2) (2005), s. 10-17

30. Alizadeh A., Alizadeh O., Sharafzadeh S., Mansoori S. *Effect of different ecological environments on growth and active substances of garden thyme*, *Advances in Environmental Biology*, 5(4) (2011), 780-783
31. Michalski J.A., Zielińska D. *Review of essential oils obtained from plants Lamiaceae family and their properties*, *Polish Journal of Cosmetology*, 18(1)(2015), s. 16-24
32. Ozguven M., Tansi S. *Drug yield and essential oil of Thymus vulgaris L. as influenced by ecological and ontogenetical variation*, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 22 (1998), s. 537-542
33. Carlen C., Schaller M., Carron C.A., Vouillamoz J.F., Baroffio C.A. *The new Thymus vulgaris L. hybrid cultivar (Varico 3) compared to five established cultivars from Germany, France and Switzerland*, *Acta Horticulturae*, 860 (2010), s. 161-166
34. Lis A. *The most valuable oils. Thyme oils*, *Aromaterapia*, 3(4) (2003), s. 5-13
35. Marzec M., Polakowski C., Chilczuk R., Kolodziej B. *Evaluation of essential oil content, its chemical composition and price of thyme (Thymus vulgaris L.) raw material available in Poland*, *Herb Polonica*, 56(3) (2010), s. 37-52
36. Adzet T., Granger R., Passet J., San Martin R. *Chemical polymorphism in the genus Thymus: taxonomic importance*, *Biochemical Systematics and Ecology*, 5 (1977), s. 269-272
37. Thompson J.D., Manicacci D., Tarayre M. *Thirty-five years of thyme: a tale of two polymorphisms*, *BioScience*, 48(10) (1998), s. 805-815
38. Thompson J.D., Chalchat J., Michet A., Linhart Y., Ehlers B. *Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of Thymus vulgaris chemotypes*, *Journal of Chemical Ecology*, 29(4)(2003), s. 859-879
39. Lawrence B. M. *Essential oils: from agriculture to chemistry*, *International Journal of Aromatherapy*, 10(3/4) (2001), s. 82-98
40. Imelouane B., Amhamdi H., Wathelet J.P., Ankit M., Khedid K., El Bachiri A. *Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of Thyme (Thymus vulgaris) from Easter Morocco*, *International Journal of Agriculture and Biology*, 11(2) (2009), s. 205-208
41. Omidbeygi M., Barzegar M., Hamidi Z., Naghdibadi H. *Antifungal activity of thyme, summer Savory and clove essential oils against Aspergillus flavus in liquid medium and tomato paste*, *Food Control*, 18 (2007), s. 1518-1523
42. Al-Saimary I.E., Bakr S.S., Khudaier B.Y. *Efficacy of antibacterial agents extracted from Thymus vulgaris L. (Lamiaceae)*, *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 4(1) (2007), s. 1-5
43. Lis A. *Olejki tymiankowe*, *Aromaterapia* (3-4) (2003), s. 5-13
44. Nurzyńska-Wierdak R. *Terapeutyczne właściwości olejków eterycznych*, *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska, Sectio EEE Horticultura*, XXV (1) (2015), s. 1-19
45. Lakis Z., Mihele D., Nicorescu I., Vulturescu V., Udeanu D.J. *The antimicrobial activity of Thymus vulgaris and Origanum syriacum essential oils on Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae and Candida albicans*, *Farmacia* 60 (6) (2012), s. 857-865
46. Sienkiewicz M., Strycharczyk M., Denys A., Kalembo D. *Aktywność przeciwbakteryjna olejku eterycznego z tymianku pospolitego (Thymus vulgaris L.) wobec bakterii z rodzaju Enterococcus*, *Acta Clinica et Morphologica*, 10 (3) (2007), s. 31-36

47. Kazemi M., Mousavi E., Bandrez N. *Chemical compositions and antibacterial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* and *Tanacetum parthenium**, Research Journal of Soil Biology, 4 (2) (2012), s. 21-31

Tymianek pospolity – wartościowa roślina przyprawowa, lecnicza i olejkodajna. Praca przeglądowa

Streszczenie

Tymianek pospolity (*Thymus vulgaris* L.) z rodziny jasnotowatych (Lamiaceae), pochodzi z rejonu Morza Śródziemnego. Jego duże zdolności adaptacyjne do warunków środowiskowych sprawiły, iż uprawiany jest na terenach o klimacie umiarkowanym całej Europy. Surowcem zielarskim jest ziele tymianku (*Thymiherba*), a główną substancją biologicznie aktywną – olejek eteryczny, występujący w wysuszonym surowcu w ilości 0,32 – 4,9%. Składnikami dominującymi olejku tymiankowego są: tymol, karwakrol, p-cymen, limonen, γ -terpinen. Ziele tymianku jest zasobne także w inne substancje biologicznie aktywne, takie jak flawonoidy, garbniki, kwasy fenolowe, związki triterpenowe i goryczkowe, saponiny, cukry, witaminy i związki mineralne. Ekstrakty z surowca tymianku oraz olejek eteryczny wykazują aktywność przeciwdrobnoustrojową, antyoksydacyjną, ponadto działają wykrztuśnie, spazmolitycznie, żółciopędnie i żółciotwórczo oraz pobudzają na czynności żołądka i wydzielanie soków trawiennych. Zawartość i skład chemiczny olejku eterycznego tymianku pozostaje pod wyraźnym wpływem czynników genetycznych i ontogenetycznych, ale podlega także czynnikom środowiskowym oraz uprawowym. Ziele oraz destylowany z niego olejek są często wykorzystywane w farmacji, przemyśle spożywczym oraz kosmetycznym.

Słowa kluczowe: Lamiaceae, *Thymiherba*, olejek eteryczny, aktywność biologiczna, warunki uprawy

***Thymus vulgaris* L. – a valuable spice, medicinal and oleiferous plant.**

A review

Abstract

Common thyme (*Thymus vulgaris* L.) from the mint family (Lamiaceae) is native to the Mediterranean region. Its high adaptability to environmental conditions means that it is grown in areas with a temperate climate all Europe. The herbal material comprises herb (*Thymiherba*) of thyme, while the essential oil, found in dried raw material at a level of 0,32 – 4,9%, is the main biologically active substance. The dominant components of thyme essential oil are as follows: thymol, carvacrol, p-cymene, limonene, α -terpinene. The thyme herb is also rich in other biologically active substances, such as flavonoids, tannins, phenolic acids, triterpene and bitter compounds, saponins, sugars, vitamins as well as mineral compounds. Thyme extracts and essential oil show antimicrobial and antioxidant activity as well as they work expectorant, spasmolytic and stimulates the activity of the stomach and the secretion of digestive juices. Essential oil synthesis in thyme is clearly influenced by genetic and ontogenetic factors, but it is also affected by environmental factors, whereas the qualitative composition of the oil is relatively constant. Herb and distilled oil from it are often used in pharmaceutical, food and cosmetic industries.

Keywords: Lamiaceae, *Thymiherba*, essential oil, biological activity, cultivation conditions

Układy dostarczania antybiotyków jako efektywna i bezpieczna alternatywa dla farmakoterapii ciężkich zakażeń bakteryjnych

1. Wstęp

Aktualna ocena skuteczności leczenia zakażeń bakteryjnych z użyciem antybiotyków definiuje obecną sytuację jako „erę postantybiotykową”. Zakażenia bakteryjne cechuje nadal wysoka śmiertelność, a ich leczenie często jest powodem niepowodzenia leczenia choroby podstawowej u hospitalizowanych pacjentów [1]. Stąd też leczenie chorób zakaźnych jest jednym z największych wyzwań współczesnej farmakoterapii. Czas badań konieczny dla wprowadzenia innowacyjnego leku oraz duże ryzyko nieaktualności opracowanych rozwiązań terapeutycznych z powodu dynamicznie zmieniającej się sytuacji leczenia chorób zakaźnych to dwa najważniejsze ograniczenia dla postępu badań nad wprowadzeniem nowych chemioterapeutyków do lecznictwa.

Problem narastającej nieefektywności leczenia chorób bakteryjnych może być indukowany przez bakterie (pojawianie się mechanizmów oporności), ale również może wynikać też ze specyfiki budowy chemicznej antybiotyków (słaba rozpuszczalność w wodzie, niska trwałość chemiczna). Może być też wypadkową budowy chemicznej i mechanizmów transportu komórkowego antybiotyków (niska biodostępność) [2-8]. Wymienione ograniczenia silnie korespondują ze spadkiem efektywności działania wybranych antybiotyków, koniecznością ograniczania chemioterapii do wybranych dróg podawania leku, czy też naruszaniem równowagi flory bakteryjnej na etapie leczenia wynikającą też z ich przedłużonej obecności w układzie pokarmowym w efekcie niskiej biodostępności.

Aktualnie, do grup chemioterapeutyków, które charakteryzują się największym potencjałem bakteriobójczego działania w zakresie szerokości spektrum działania, jak również siły działania wobec bakterii, których eradykacja stanowi często problem kliniczny należą: analogi β -laktamowe

¹magda.paczowska@gmail.com; Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, www.ump.edu.pl

²jpiontek@ump.edu.pl; Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, www.ump.edu.pl

z grupy karbapenemów (meropenem, ertapenem, dorypenem, biapenem, tebipenem piwoksyl) [9].

Możliwość modyfikacji właściwości bakteriobójczych i fizykochemicznych omawianych chemioterapeutyków może stanowić istotne rozwiązanie dla wymienionych wyższej ograniczeń. Wprowadzenie omawianych chemioterapeutyków w układy binarne z odpowiednimi modyfikatorami o strukturze polimerowej może stanowić efektywną alternatywę dla obecnie stosowanej farmakoterapii chemioterapeutykami. Biorąc pod uwagę charakter ograniczeń dla farmakoterapii omawianymi chemioterapeutykami, za zasadne należy uznać preparatykę ich układów z pochodnymi cyklodekstryn, które spełniają wszystkie z kryteriów stawianych nowoczesnym substancjom pomocniczym. Zaproponowane modyfikatory przy znanym poziomie bezpieczeństwa toksykologicznego mogą istotnie zmieniać właściwości bakteriobójcze, fizykochemiczne oraz przenikalność przez błony biologiczne [10-11].

Cyklodekstryny są modyfikatorami, które poprzez tworzenie układów kompleksowych typu „gość-gospodarz”, mogą zwiększać rozpuszczalność substancji biologicznie czynnych, zwiększać przenikanie substancji przez błony biologiczne, a w konsekwencji zwiększać biodostępność cząsteczki „gościa” [12-18]. Ponadto, cyklodekstryny mogą redukować gorzki smak i modyfikować jego odczuwanie w efekcie kompleksowania z wybranymi lekami [19-22]. Wśród możliwości zastosowania cyklodekstryn należy wskazać ich użycie jako stabilizatorów zwiększających trwałość chemiczną leków [23-25].

2. Cel pracy

Celem niniejszej pracy było wyznaczenie algorytmu postępowania podczas opracowania układu dostarczania leków z grupy antybiotyków oraz potwierdzenie jego poprawności w efekcie prowadzonych badań eksperymentalnych. Jako modelowe substancje z grupy karbapenemów wybrano analog podawany parenteralnie – meropenem i podawany doustnie – tebipenem piwoksyl. Jako nośniki dla badanych układów dostarczania leków zaproponowano pochodne cyklodekstryn.

3. Przebieg badań

3.1. Preparatyka układów dostarczania leków

Wśród metod preparatyki kompleksów cyklodekstrynowych w fazie stałej można wymienić: ugniatanie na sucho, ugniatanie z obecnością lotnego rozpuszczalnika, kriomielenie oraz współstrącanie [26].

Do badanego układu modelowego wybrano jako metodę preparatyki – ugniatanie. Zrezygnowanie z obecności rozpuszczalnika podczas preparatyki układu było zamierzone i oparte o doniesienia dotyczące możliwości rozkładu badanych analogów w obecności wybranych rozpuszczalników (woda, etanol).

Układy meropenemu (MER) z β -cyklodekstryną (β -CD) i tebipenemu piwoksyli (TP) z β -cyklodekstryną (β -CD) przygotowano w stosunkach molowych 1:1 metodą ugniatania. Następnie przygotowane układy suszono w temperaturze 25°C w suchym powietrzu (wilgotność względna powietrza RH = 0%).

3.2. Badania tożsamości układów dostarczania leków

Tworzenie układów lek – cyklodekstryna w dużym stopniu zależy od wymiarów cyklodekstryny oraz od rozmieszczenia grup funkcyjnych w cząsteczce leku. Układy utworzone pomiędzy cząsteczką gościa a cząsteczką cyklodekstryny można scharakteryzować m.in. za pomocą spektroskopii w podczerwieni i ramanowskiej oraz różnicowej kalorymetrii skaningowej.

3.2.1. Spektroskopia w podczerwieni i Ramana

Spektroskopia wykorzystywana jest w celu określenia oddziaływań pomiędzy cząsteczką gościa a cyklodekstryną. Widma dają informację dotyczącą udziału wodoru w różnych grupach funkcyjnych, a zatem zmiana częstotliwości, intensywności czy poszerzenie pasm może być spowodowane przez rozciąganie drgań grup uczestniczących w tworzeniu wiązań wodorowych w układzie.

W przypadku prezentowanych badań widma absorpcyjne kompleksów meropenemu z β -cyklodekstryną i tebipenemu piwoksyli z β -cyklodekstryną w zakresie podczerwieni zostały zarejestrowane przy pomocy spektrometru fourierowskiego FT-IR firmy Bruker Equinox 55 wyposażonego w mikroskop Bruker Hyperion 1000. Pomiar przeprowadzono w zakresie od 400 cm^{-1} do 7000 cm^{-1} . Natomiast pomiary widm rozpraszania Ramana zostały wykonane przy użyciu spektrometru LabRAM HR800 firmy HORIBA JobinYvon, przy długości fali wzbudzającej lasera $\lambda_{\text{wzb}} = 633 \text{ nm}$ (laser He-Ne). Widma zarejestrowano w zakresie od 100 do 3500 cm^{-1} .

3.2.2. Różnicowa kalorymetria skaningowa

Metody termiczne, w tym różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC, ang. *differential scanning calorimetry*) określają jakim zmianom termicznym ulega lek w efekcie tworzenia kompleksu z cyklodekstrynami.

Do obserwowanych zmian należy zaliczyć topnienie, odparowanie, rozkład czy zmiany form polimorficznych. Zmiany temperatur topnienia leku po skompleksowaniu wskazują na tworzenie układu z cyklodekstryną. Wpływ cyklodekstryny na termogramie obserwowany jest jako poszerzenie, przesunięcie, pojawienie się nowych pików lub zanik pików.

Analiza kompleksów meropenemu z β -cyklodekstryną i tebipenemu piwoksylu z β -cyklodekstryną została przeprowadzona z zastosowaniem różnicowego kolorymetru skaningowego Mettler Toledo DSC 1 Star System. Próbki były ogrzewane od 40 do 340°C przy stałym wzroście temperatury o 10°C/min w atmosferze azotu.

3.3. Badania właściwości ważnych z punktu widzenia zastosowań farmaceutycznych

Wśród najważniejszych właściwości istotnych dla działania układów dostarczania antybiotyków karbapenemowych należy: rozpuszczalność w wodzie w temperaturze pokojowej, szybkość rozpuszczania w temperaturze ciała ludzkiego, trwałość chemiczna, przenikalność przez błony biologiczne oraz aktywność bakteriobójcza. Dla badanych układów meropenemu z β -cyklodekstryną i tebipenemu piwoksylu z β -cyklodekstryną oceniono możliwość modyfikacji każdej z wymienionych wyżej właściwości.

Jako wiarygodne narzędzie analityczne do oceny zmian stężenia analitów we wszystkich prowadzonych badaniach zostały opracowane metody ultrasprawnej/wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem diodowym (UHPLC-DAD, ang. *ultra-performance liquid chromatography*, HPLC-DAD, ang. *high-performance liquid chromatography*). Opracowane metody pozwoliły na oznaczanie stężenia badanej substancji w układach, także w obecności ich substancji pokrewnych (zanieczyszczeń i produktów rozkładu). Metody zostały zwalidowane zgodnie z wytycznymi ICH i przewodników farmakopealnych w odniesieniu do ich selektywności, precyzji, dokładności oraz wyznaczenia wartości limitów wykrywalności (LOD) i limitów oznaczalności (LOQ) poszczególnych substancji aktywnych farmakologicznie (API, ang. *active pharmaceutical ingredient*) [28, 29].

Rozdzielenie chromatograficzne meropenemu od produktów rozkładu i zanieczyszczeń uzyskano metodą HPLC-DAD stosując jako fazę stacjonarną: kolumnę LiChrospher RP-18 (250mm × 4 mm, 5 μ m), jako fazę ruchomą mieszaninę: 12mmol/L octanu amonu i acetonitrylu (92:8 V/V), szybkość przepływu fazy ruchomej 1,0mL/min. Długość fali detekcji wynosiła 298 nm, a temperatura kolumny 25°C [30].

Rozdzielenie chromatograficzne tebipenemu piwoksylu od produktów rozkładu i zanieczyszczeń uzyskano metodą UHPLC-DAD stosując jako fazę stacjonarną: kolumnę Kinetex C-18 (100 mm × 2,10 mm, 2,6 μm), jako fazę ruchomą mieszaninę: 0,1% kwasu mrówkowego i acetonitrylu (20:80 V/V), szybkość przepływu fazy ruchomej 0,5 ml/min i wielkość nastrzyku 5 μl. Długość fali detekcji wynosiła 330 nm, a temperatura kolumny 25°C [31].

3.3.1. Badania rozpuszczania

Według wytycznych FDA, substancja jest dobrze rozpuszczalna w wodzie kiedy największa ilość rozpuszcza się w objętości 250 ml lub mniejszej wodnego medium w zakresie pH 1,0-6,8 [27].

3.3.2. Badania szybkości rozpuszczania

Badanie szybkości rozpuszczania substancji czynnej przeprowadzono zgodnie z wymogami Farmakopei Polskiej [32]. Badanie zostało przeprowadzone w „warunkach *sink*” tj. w taki sposób, że substancja już rozpuszczona w roztworze nie wywiera znaczącego wpływu na szybkość pozostającej uwalnianej substancji.

Ocena modyfikacji szybkości rozpuszczania chemioterapeutyku w układzie z cyklodekstryną przeprowadzona została w oparciu o różnicę stężenia chemioterapeutyku w układzie, a w stosunku do samego chemioterapeutyku w płynie akceptorowym.

Badania szybkości rozpuszczania zostały przeprowadzone z wykorzystaniem aparatu łożatkowego do uwalniania Agilent 708-DS (Agilent Technologies) w temperaturze $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, z szybkością mieszania 50 obr/min. Substancje zostały umieszczone w kapsułkach żelatynowych, które umieszczono w sprężynach w celu uniknięcia unoszenia się kapsułki na powierzchni cieczy. Tak otrzymane próby umieszczono w 500 ml odpowiedniego medium (bufor fosforanowy o pH ~ 7,2, odpowiadający pH treści jelitowej – MER i MER-βCD; sztuczny sok żołądkowy – TP i TP-βCD). W odpowiednich odstępach czasu pobierano próbę (5,0 ml), sączono przez filtr membranowy o średnicy porów 0,45 μm. Stężenie rozpuszczonej substancji mierzono przy użyciu metod HPLC/UHPLC-DAD.

3.3.3. Badania przenikania przez modelowe układy błonowe

Według wytycznych FDA, przepuszczalność substancji, mierzona jako ułamek dawki przenikającej przez nabłonek ludzkiego jelita, może być ekstrapolowana do stopnia jego wchłaniania u ludzi. Alternatywnymi układami do badania stopnia wchłaniania leków mogą być modele *in situ* zwierzęce lub *in vitro* hodowle komórek nabłonkowych. Według wytycz-

nych substancja jest wysoce przenikalna kiedy 85% podanej dawki zostanie wchłonięta [27].

Równoległy test przepuszczalności przez błony sztuczne (PAMPA) służy jako model *in vitro* biernego przenikania międzykomórkowego. Zdolność tego testu do oceny przepuszczalności w szerokim zakresie pH ma na celu dać informacje jak nowe układy doustne mogą być absorbowane w całym przewodzie żołądkowo-jelitowym [33].

Test PAMPA składa się z 96-dołkowych mikropyłek filtracyjnych, tak że każda składowa podzielona jest na dwie komory, donora na dole i akceptora na górze, oddzielonych przez mikrofiltr o grubości 120 μm , powlekany 20% roztworem lecytyny. Płytki z lekiem umieszczonym w części donorowej, inkubuje się w temperaturze 25°C i 37°C przez 4 godziny. Po inkubacji, płytki rozdziela się, a w roztworze dawcy i akceptora oznacza stężenie leku przy użyciu metod HPLC/UHPLC-DAD.

Ocenę wpływu cyklodekstryny na przenikanie chemioterapeutyku określa się poprzez porównanie pozornej przepuszczalności (P_{app}) chemioterapeutyku samego oraz chemioterapeutyku w układzie z cyklodekstryną.

Analiza przenikania przez model nabłonka jelitowego była prowadzona tylko w przypadku doustnego karbapenemu – tebipenemu piwoksylu.

3.3.4. Badania trwałości chemicznej

Badania trwałości układów chemioterapeutyk-modyfikator prowadzone były zgodnie z wytycznymi ICH [34]. Celem badań trwałości jest dostarczenie informacji o tym, jak substancja czynna zmienia się z upływem czasu pod wpływem różnych czynników środowiskowych, takich jak temperatura, wilgotność czy światło oraz ustalenie okresu trwałości substancji leczniczej i warunków jej przechowywania.

Ocena trwałości chemicznej została przeprowadzona w roztworach wodnych (w warunkach hydrolizy kwasowo-zasadowej) dla analogu ulegającego degradacji w warunkach hydrolizy oraz w fazie stałej (w suchym powietrzu, powietrzu o niekontrolowanej wilgotności, powietrzu o podwyższonej wilgotności względnej ($\text{RH} > 50\%$) dla analogów ulegających degradacji w warunkach termolizy.

Badania trwałości MER i MER- β -CD zostały przeprowadzone w roztworach: w kwasie chlorowodorowym ($c = 0,2 \text{ mol/l}$, $T = 30\text{-}60^\circ\text{C}$), roztworze wodorotlenku sodu ($c = 0,01 \text{ mol/l}$, $T = 30\text{-}60^\circ\text{C}$) i nadtlenu wodoru ($c = 1\text{-}4\%$, $T = 30^\circ\text{C}$), oraz w fazie stałej: w warunkach podwyższonej wilgotności względnej powietrza ($\text{RH} \sim 76\%$, $T = 40\text{-}70^\circ\text{C}$) oraz w suchym powietrzu ($\text{RH} = 0\%$, $T = 70\text{-}110^\circ\text{C}$).

Badania trwałości TP oraz TP- β CD zostały przeprowadzone w fazie stałej: w warunkach podwyższonej wilgotności względnej powietrza (RH ~ 76%, T = 30-60°C) oraz w suchym powietrza (RH = 0%, T = 60-100°C).

Badane karbapenemy w formach skompleksowanych były bardziej odporne na działanie czynników rozkładu.

3.3.5. Badanie aktywności mikrobiologicznej

Wyznaczenie wartości MIC dla binarnych układów chemioterapeutyk-cyklodekstryna oznaczone było z zastosowaniem metody seryjnych rozcieńczeń substancji aktywnej na podłożu płynnym (podłoże Muellera-Hintona, Oxoid) z wykorzystaniem 96-dołkowej płytki titracyjnej. Wszystkie dołki zostały zaszczipione 24h hodowlą mikroorganizmów wskaźnikowych o znormalizowanej gęstości optycznej. Najniższe stężenie substancji aktywnej, przy którym nie rozwijają się drobnoustroje (podłoże hodowlane przejrzyste) stanowi wartość MIC. Określenie wartości MIC zostało przeprowadzone dla istotnych z punktu rozwijania się oporności bakteryjnych patogenów ludzkich takich jak *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25923 i *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Dla wybranych szczepów drobnoustrojów, wobec których badane układy zostały określone jako najbardziej aktywne została przeprowadzona analiza cytometryczna z zastosowaniem cytometru przepływowego celem zbadania kinetyki zmian liczebności i żywotności w czasie.

Aktywność bakteriostatyczna badanych karbapenemów względem wybranych szczepów była większa po ich skompleksowaniu z cyklodekstrynami.

4. Wyniki

W efekcie preparatyki kompleksów meropenemu i tebipenemu piwoksylu metodą ugniatania otrzymano układy, których tożsamość oceniono metodami termicznymi (DSC) i spektralnymi (FT-IR i Ramana). Analiza widm spreparowanych kompleksów wykazała zmiany w położeniu i intensywności wybranych pasm, co może wskazywać na obecność oddziaływań odpowiedzialnych za otrzymanie kompleksów cyklodekstrynowych z karbapenenami. Także na termogramach odnotowywano przesunięcia dla temperatur topnienia po wprowadzeniu karbapenemu do cyklodekstryny.

W efekcie zastosowania wyżej opisanych metod wykazano:

- wartości rozpuszczalności dla meropenemu i tebipenemu piwoksylu w formie wolnej i związanej z cyklodekstryną w temperaturze 25°C i 37°C,

- profile szybkości rozpuszczania dla meropenemu i kompleksu meropenemu z β -cyklodekstryną w buforze fosforanowym o pH \sim 7,2 w temperaturze 37°C oraz dla tebipenemu piwoksylu i tebipenemu piwoksylu w formie związanej z cyklodekstryną w sztucznym soku żołądkowym w temperaturze 37°C,
- większą przenikalność przez model sztucznych błon dla tebipenemu piwoksylu po jego skompleksowaniu,
- większą odporność skompleksowanych karbapenemów na rozkład chemiczny w efekcie działania czynników rozkładu,
- większą aktywność bakteriobójczą skompleksowanych karbapenemów względem określonych szczepów bakteryjnych.

5. Wnioski

Prowadzone badania wykazały możliwość modyfikacji właściwości istotnych dla zastosowania terapeutycznego badanych karbapenemów (zwiększenie aktywności bakteriostatycznej, poprawa trwałości chemicznej, lepsza rozpuszczalność, wzrost przenikania przez modelowe układy błon) w efekcie zmian ich właściwości fizykochemicznych po połączeniu z wybraną cyklodekstryną.

Podziękowania

Badania finansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki (Preludium, 2015/17/N/NZ7/00937).

Literatura

1. Leekha D., Terrell C., Edson R. *General Principles of Antimicrobial Therapy*, Mayo Clinic Proceedings, 86(2) (2011), s. 156-167
2. Cielecka-Piontek J., Michalska K., Zalewski P., Zasada S. *Comparative review of analytical techniques for determination of carbapenems*, Current Analytical Chemistry, 8(1) (2012), s. 91-115
3. Tenover F.C. *Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria*, American Journal of Medicine, 119 (2006), s. S3-10
4. Dzidic S., Suskovic J., Kos B. *Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects*, Food Technology and Biotechnology, 46(1) (2008), s. 11-21
5. Barbosa T.M., Levy S.B. *The impact of antibiotic use on resistance development and persistence*, Drug Resistance Updates, 3 (2000), s. 303-311
6. Pandit N., Singla R.K., Shrivastava B. *Current Updates on Oxazolidinone and Its Significance*, International Journal of Medicinal Chemistry, (2012), doi:10.1155/2012/159285

7. Levison M.E., Levison J.H. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Antibacterial Agents*, Infectious Disease Clinics of North America, 23(4) (2009), s. 791-vii
8. Carryn S., Van Bambeke F., Mingeot-Leclercq M.P., et al. Comparative intracellular (THP-1 macrophage) and extracellular activities of beta-lactams, azithromycin, gentamicin, and fluoroquinolones against *Listeria monocytogenes* at clinically relevant concentrations, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(7) (2002), s. 2095-2103
9. Papp-Wallace K.M., Endimiani A., Taracila M.A., Bonomo R.A. *Carbapenems: Past, Present, and Future*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(11) (2011), s. 4943-4960
10. Del Valle E.M.M. *Cyclodextrins and their uses: a review*, *Process Biochemistry*, 39(9) (2004), s. 1033-1104
11. Szejtli J. *Past, present, and future of cyclodextrin research*, *Pure and Applied Chemistry*, 76(10) (2004), s. 1825-1845
12. Brewster M.E., Loftsson T. *Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers*, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(7) (2007), s. 645-666
13. Muankaew C., Jansook P., Stefánsson E., Loftsson T. *Effect of γ -cyclodextrin on solubilization and complexation of irbesartan: influence of pH and excipients*, *International Journal of Pharmaceutics*, 474(1-2) (2014), s. 80-90
14. Veiga H., Teixeira-Dias J.J.C., Kedzierewicz F., Sousa A., Mamcent P. *Inclusion complexation of tolbutamide with β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin*, *International Journal of Pharmaceutics*, 129 (1996), s. 63-71
15. Becket G., Schep L.J., Tan M.Y. Improvement of the in vitro dissolution of praziquantel by complexation with α -, β - and γ -cyclodextrins, *International Journal of Pharmaceutics*, 179 (1999), s. 65-71
16. Cappello B., Carmingnani C., Iervolino M., Immacolata M., Rotonda L., Saettone M.F. *Solubilization of tropicamide by hydroxypropyl- β -cyclodextrin and water soluble polymers: in vitro/in vivo*, *International Journal of Pharmaceutics*, 213 (2001), s. 75-81
17. Wong J.W., Yuen K.H. Improved bioavailability of artemisinin through inclusion complexation with β - and γ - cyclodextrins, *International Journal of Pharmaceutics*, 227 (2001), s. 177-185
18. Liu X., Lin H.S., Chan S.Y., Ho P.C. Biopharmaceutics of β -cyclodextrin derivative-based formulations of Acitretin in sprague-dawley rats, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93 (2004), s. 805-815
19. Szejtli J., Szente L. *Elimination of bitter, disgusting tastes of drugs and food by cyclodextrins*, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 61 (2005), s. 115-125
20. Lee C.W., Kim S.J., Youn Y.S., Widjojokusumo E., Lee Y.H., Kim J., Lee Y.W., Tjandrawinatac R.R. Preparation of bitter taste masked cetirizine dihydrochloride/ β -cyclodextrin inclusion complex by supercritical antisolvent (SAS) process, *The Journal of Supercritical Fluids*, 55(1) (2010), s. 348-357
21. Stojanov M., Wimmer R., Larsen K.L. Study of the inclusion complexes formed between cetirizine and α -, β -, and γ -cyclodextrin and evaluation on

- their taste-masking properties, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8 (2011), s. 3177-3185
22. Ali M., EL-Massik M.A., Abdallah O.Y., Abdelkader H. *Reduction of Bitterness and Enhancing Palatability of Cetirizine Oral Liquid Dosage Forms by Cyclodextrins*, *Journal of Pharmaceutics & Drug Development*, 1(3) (2014), s. 302
 23. Lin H.S., Chean C.S., Ng Y.Y., Chan S.Y., Ho P.C. *2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin increases aqueous solubility and photostability of all-trans-retinoic acid*, *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 25 (2000), s. 265-269
 24. Liu X., Lin H.S., Thenmozhiyal J.C., Chan S.Y., Ho P.C. *Inclusion of Acitretin into cyclodextrins: Phase solubility, photostability study and physicochemical characterization*, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92 (2003), s. 2449-2457
 25. Rasheed A., Kumar A., Sravanthi V. *Cyclodextrins as Drug Carrier Molecule: A Review*, *Scientia Pharmaceutica*, 76 (2008), s. 567-598
 26. Uekama K., Hirayama F. *Methods of investigating and preparing inclusion compounds*. W: Duchene D., editor. *Cyclodextrins and Their Industrial Uses*, Paris, France: Editions de Santé, (1987), s. 131-172
 27. Food and Drug Administration. *Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System*, (2015)
 28. ICH (International Conference on Harmonisation) *Harmonised Tripartite Guideline, Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)*, (2005)
 29. European Pharmacopoeia 7.0, *Validation of Analytical Procedures*, (2014).
 30. Zalewski P., Cielecka-Piontek J., Paczkowska M. *Development and validation of stability-indicating HPLC method for simultaneous determination of meropenem and potassium clavulanate*, *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 7(4) (2014), s. 255-260
 31. Cielecka-Piontek J., Zalewski P., Paczkowska M. *A validated stability indicating HPLC-DAD method of tebipenem pivoxil and its degradation products*, *Journal of Chromatographic Science*, 53(2) (2015), s. 325-330
 32. *Farmakopea Polska*, wyd. VII, *Uwalnianie substancji czynnej ze stałych postaci leku*, (2007), s. 337-343
 33. Niazi S.K. *Handbook of Bioequivalence Testing*, Second Edition, CRC Press, (2014), s. 184-189
 34. ICH (International Conference on Harmonisation) *Harmonised Tripartite Guideline, Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2)*, (2003)

Układy dostarczania antybiotyków jako efektywna i bezpieczna alternatywa dla farmakoterapii ciężkich zakażeń bakteryjnych

Streszczenie

Celem niniejszej pracy było zbadanie możliwości modyfikacji właściwości istotnych dla efektywności farmakologicznej wybranych analogów β -laktamowych, karbapenemów, poprzez ich skompleksowanie z wybranymi pochodnymi cyklodekstryn. Jako istotne właściwości, które mogą być modyfikowane w efekcie oddziaływania z nośnikiem, badano: rozpuszczalność w wodzie w temperaturze pokojowej i 37°C, szybkość rozpuszczania w temperaturze 37°C, trwałość chemiczną, przenikalność przez model błonowy oraz aktywność bakteriobójczą. Kolejne etapy badań obejmowały preparatykę układów lek-nośnik, ocenę tożsamości utworzonego układu lek-nośnik oraz badania modyfikacji właściwości istotnych dla farmakoterapii karbapenemami. W pracy zaprezentowano procedury przygotowania oraz wykonania oznaczeń dla badanych układów karbapenem-cyklodekstryna z wykorzystaniem metod analitycznych z grupy technik termicznych (DSC), spektralnych (FT-IR, Raman) oraz chromatograficznych (UHPLC/HPLC-DAD). Przeprowadzone badania wykazały możliwość modyfikacji właściwości istotnych dla farmakoterapii karbapenemami w efekcie ich oddziaływania z badanymi nośnikami.

Słowa kluczowe: antybiotykoterapia, karbapenemy, cyklodekstryny

Delivery systems of antibiotics as an effective and safe alternative to pharmacotherapy severe bacterial infections

Abstract

The aim of the study was to investigate the possibility of modifying the properties relevant regarding to the pharmacological effectiveness of selected β -lactam antibiotics, carbapenems, as a result of complexation with cyclodextrin derivatives. Following relevant properties were selected: the aqueous solubility at room temperature and at 37°C, the dissolution rate at 37°C, chemical stability, permeability and antimicrobial activity. The study involved: the preparation of drug-carrier systems, characterization of the obtained drug-carrier systems and studies of relevant properties important for carbapenem pharmacotherapy. This paper describes the preparation and studies of the carbapenem-cyclodextrin systems by using thermal (DSC), spectral (FT-IR, Raman) and chromatographic (UHPLC/HPLC-DAD) techniques. The study showed the possibility of modifying the properties relevant for carbapenems pharmacotherapy by drug carrier-carbapenems interactions.

Keywords: antibiotics, carbapenems, cyclodextrins

Wpływ stresu oksydacyjnego na biotransformację β -pinenu przy użyciu psychotropicznego grzyba *Chryso sporium pannorum*

1. Wstęp

W ogólnie przyjętej nomenklaturze wszystkie naturalne związki pochodzenia roślinnego zbudowane z podjednostek izoprenu określa się jako terpeny. Wyróżnia się dwa kryteria ich klasyfikacji. Zgodnie z pierwszym kryterium, ze względu na obecność pierścienia atomów węgla w cząsteczce, wyróżnia się: terpeny pierścieniowe (zbudowane z jednego lub dwóch pierścieni) oraz terpeny łańcuchowe (niecykliczne). W drugim kryterium uwzględniana jest liczba jednostek izoprenowych, wchodzących w skład terpenu. Olejki eteryczne wytwarzane przez wiele gatunków roślin składają się głównie z lotnych związków terpenowych, a w szczególności z monoterpenów. Biologiczne i ekochemiczne funkcje terpenów nie zostały jeszcze do końca zbadane. Wiele roślin wytwarza lotne terpeny w celu przyciągnięcia konkretnych owadów mających zapylić kwiaty lub skosztować nasiona rośliny, które po wydaleniu przez zwierzę przetransportuje je w inne miejsce. Mniej lotne, ale bardzo gorzkie lub toksyczne terpeny również mogą chronić rośliny przed zjedzeniem przez zwierzęta [1]. Człowiek docenił potencjał związków terpenowych po potwierdzeniu, ich właściwości przeciwnowotworowych, antibakteryjnych i owadobójczych. Bardzo szybko rosnąca ilość drobnoustrojów wykazujących oporność wobec leków stosowanych obecnie przyczyniła się do wzrostu zainteresowania nad badaniami i wykorzystaniem produktów roślinnych działających nie tylko biostatycznie i biobójczo, ale również

¹krzysztof.jedrzejewski@poczta.umcs.lublin.pl, Zakład Mikrobiologii Przemysłowej, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie Skłodowskiej, www.umcs.pl/pl/biologia-i-biotechnologia.htm

²janek@poczta.umcs.lublin.pl, Zakład Mikrobiologii Przemysłowej, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie Skłodowskiej, www.umcs.pl/pl/biologia-i-biotechnologia.htm

³glatsmatin@gmail.com, Zakład Mikrobiologii Przemysłowej, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie Skłodowskiej, www.umcs.pl/pl/biologia-i-biotechnologia.htm

⁴mkutya61@gmail.com, Zakład Mikrobiologii Przemysłowej, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie Skłodowskiej, www.umcs.pl/pl/biologia-i-biotechnologia.htm

obniżających wirulencję i mających zdolność do modulowania oporności bakterii. Obecnie poszukuje się olejków eterycznych wykazujących działanie synergistyczne ze stosowanymi obecnie antybiotykami. Badania nad nimi prowadzone dają duże nadzieje na wykorzystanie w medycynie [2]. Terpenoidy wykorzystano również w wielu gałęziach przemysłu, głównie spożywczym i chemicznym, gdzie nadal poszukuje się sposobów pozyskiwania nowych związków pochodzenia naturalnego [3]. Pozyskuje się je na wiele różnych sposobów, poczynając od zbioru roślin, rozdrabniania i suszenia, poprzez ich destylację z wykorzystaniem pary wodnej, po ekstrakcję rozpuszczalnikami organicznymi z rozdrobnionych elementów roślin [1, 4]. Jednak uzyskiwanie najbardziej wartościowych terpenów tymi metodami jest mało opłacalne, gdyż ich stężenie w roślinach jest zazwyczaj niewielkie. Mikrobiologiczna biotransformacja związków terpenowych może stanowić alternatywę dla pozyskiwania ich z materiału roślinnego. Niektóre mikroorganizmy są w stanie przekształcać tanie monoterpény, np. α -pinen do dużo droższych, jak werbenon i werbenol. Cały czas trwają badania nad biotransformacją terpenów w celu opracowania efektywnej metody wykorzystywania tego typu substratów do przemysłowego otrzymywania związków smakowo-zapachowych [4, 5]. Badania rynkowe wykazują, że produkty pochodzenia naturalnego są lepiej odbierane przez konsumentów, co czyni biotransformację bardzo atrakcyjną [6].

Procesy metaboliczne mikroorganizmów w dużej mierze zależą od warunków środowiska. Zmiany temperatury, pH, ciśnienia osmotycznego, czy obecność reaktywnych form tlenu (RFT) mogą wywoływać u nich stres, który indukuje w ich komórkach mechanizmy odpowiedzialne za adaptację do nowego otoczenia. Zakres zmian determinuje zachowanie organizmu, który może zahamować wzrost, pozostać dłużej w fazie lag, zmniejszyć tempo wzrostu lub zginąć [7]. Organizmy ekstremofilne, do których zaliczamy grzyby psychrotroficzne mają duże zdolności przystosowawcze, co jest niezbędne w trudnych warunkach środowiska i dzięki czemu wykazują wiele cech zwiększonej tolerancji na czynniki stresowe [8]. Wśród organizmów żyjących w warunkach tlenowych (aerobów) ważnym czynnikiem jest zachowanie równowagi pomiędzy stężeniem powstających RFT, a ich eliminacją. Gdy zostanie zachwiana równowaga tego procesu w kierunku zwiększenia ilości reaktywnych form tlenu, wówczas stan ten nazywa się stresem oksydacyjnym. Stanowi on główną przyczynę powstania zmian w strukturze i funkcji błon plazmatycznych [9]. Za powstawanie stresu oksydacyjnego odpowiadają związki chemiczne, głównie nadtlenki i ponadtlenki, które mają wpływ na powstawanie reaktywnych form tlenu. Wodoronadtlenek *tert*-butylu (*t*BOOH) jest jedną z najbardziej aktywnych substancji tego typu. Jego

obecność powoduje powstawanie silnych związków utleniających, w tym rodnika hydroksylowego, powodującego uszkodzenia wielu struktur komórkowych [10, 11].

Wiele badań na temat stresu oksydacyjnego prowadzi się na organizmach prokariotycznych, drożdżach i komórkach ssaczych, stosunkowo mało poznany jest jego wpływ na grzyby nitkowate [12]. Stwierdzono, że praktycznie u wszystkich dotąd zbadanych gatunków grzybów w odpowiedzi na stres oksydacyjny zaangażowane są podobne enzymy, takie jak katalazy, peroksydazy, czy dysmutazy ponadtlenkowe [13,14]. Potwierdzono, że komórki wystawione na jeden rodzaj stresora często stają się odporne na szerokie spektrum niekorzystnych czynników [15, 16]. Odpowiednio dobrane warunki stresowe w hodowli mikroorganizmów wykorzystywanych do biotransformacji terpenów (np. β -pinenu) mogą wykazywać nowe przystosowania w przekształcaniu tych substratów do wartościowych produktów.

2. Cel pracy

Celem tej pracy było określenie wpływu stresu oksydacyjnego na tempo oddychania grzybni i wydajność biotransformacji β -pinenu przy zastosowaniu psychrotroficznego szczepu *Chrysosporium pannorum*.

3. Materiały i metody

3.1. Mikroorganizm

W doświadczeniach wykorzystano psychrotroficzny szczep grzyba nitkowatego *Chrysosporium pannorum*, pochodzący z kolekcji Zakładu Mikrobiologii Przemysłowej UMCS, pierwotnie wyizolowany z arktycznej tundry (Zachodni Spitsbergen). Wykazuje on wzrost i aktywność enzymatyczną w niskich temperaturach (4-30°C), oraz potwierdzoną wcześniej zdolność do biotransformacji niektórych związków terpenowych [17]. Biotransformacja w niskiej temperaturze (15-20°C) pozwoli zmniejszyć straty substratu (β -pinenu) wywołane jego lotnością [18].

3.2. Odczynniki chemiczne

- (1S)-(-)- β -pinen 99%, Sigma Aldrich
- (-)-Linalol 97% (GC), FLUKA Chemika
- Wodoronadtlenek *tert*-butylu, roztwór 70% w wodzie, FLUKA Chemika
- Eter dietylowy – POCH Gliwice

3.3. Podłoża

3.3.1. Podłoże stosowane do przechowywania drobnoustrojów

Grzyba *C. pannorum* przechowywano na skosach sporządzonych z agaru brzeczkowego. W skład podłoża wchodziła brzeczka słodowa rozcieńczona wodą destylowaną w proporcji 1:1 (ok 7°B), zestalona agarem o stężeniu 2%. Grzybnię wyrośniętą na tej pożywce w 20°C przechowywano w lodówce (4°C).

3.3.2. Podłoże płynne stosowane do hodowli oraz procesu biotransformacji

Zarówno do hodowli grzyba *C. pannorum* jak również w procesie biotransformacji wykorzystano podłoże podstawowe, o składzie (w %):

- glukoza 1,0
- ekstrakt słodowy 1,0
- ekstrakt drożdżowy 0,5
- bacto-pepton 0,5

Wartość pH podłoża do hodowli grzybni *C. pannorum* wynosiła 8, natomiast do procesu biotransformacji używano pożywki podstawowej o pH=6,15.

Pożywkę sterylizowano w kolbach płaskodennych a'100 ml w autoklawie parowym w temperaturze 117°C, przy nadciśnieniu 0,075MPa przez 20 min.

3.4. Metody badań

3.4.1. Warunki hodowli

Do hodowli grzybni *C. pannorum* zastosowano płaskodenne kolby szklane o pojemności 100 ml zawierające 25 ml podłoża hodowlanego o pH=8. Kolby w warunkach jałowych szczepiono 1,5 ml zawiesiny konidiów *Chrysosporium pannorum* o gęstości $8,5 \times 10^6$ zarodników/ml. Zawiesinę przygotowywano poprzez dodanie 10 ml jałowej wody destylowanej z 0,01% Tween 80 do jednego skosu agarowo-brzeczkowego i zdrapanie konidiów za pomocą ezy. Hodowlę prowadzono na wytrząsarce przy 150 obr/min., w temperaturze 20°C przez okres 24 godzin, uzyskując grzybnię w formie niewielkich peletów. Następnie grzybnię inkubowano z czynnikiem stresowym w postaci wodoronadtlenku *tert*-butylu (*t*BOOH) w ciągu 24 godzin (wyjątek patrz 3.5.3).

3.4.2. Warunki prowadzenia procesu biotransformacji

Grzybnię po stresie oksydacyjnym przemywano płynem fizjologicznym. W dalszej kolejności grzybnię ważono i przenoszono równe ilości do kolbek z podłożem podstawowym o pH=6,15. Następnie dodawano 1% substratu (β -pinenu). Proces biotransformacji prowadzono na wytrząsarce przy 160 obr/min, w temperaturze 20°C przez okres 48h (wyjątek opisano w 3.5.4).

3.4.3. Izolacja produktów biotransformacji

Po inkubacji w obecności substratu, grzybnię oddzielono przy pomocy sączka z bibuły filtracyjnej, a uzyskany w ten sposób płyn pohodowlany poddawano ekstrakcji. Jako fazę organiczną w rozdzielniku zastosowano eter dietylowy w objętości równej ilości płynu pohodowlanego (25 ml). Proces rozdzielania prowadzono z dodatkiem 250 μ l wzorca wewnętrznego (roztwór linalolu w heksanie o stężeniu 0,1%). Z uzyskanej w rozdzielnikach fazy organicznej odparowywano eter dietylowy, a uzyskaną frakcję terpenową zawieszano w 2 ml heksanu i umieszczano w szczelnych fiolkach z przyciemnianego szkła.

3.4.4. Analiza produktów biotransformacji β -pinenu

Produkty biotransformacji analizowano przy użyciu chromatografu gazowego Chrompack 3380 firmy Varian, wyposażonego w detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID). Z gotowych chromatogramów, na podstawie porównania powierzchni pików powstałych produktów biotransformacji z pikami wzorca obliczano stężenie (mg/l) otrzymanych związków. Wydajność procesu biotransformacji definiowano jako stężenie produktu w przeliczeniu na gram suchej masy grzybni (stęż./g s. m.).

3.4.5. Oznaczanie suchej masy grzybni

Odsączoną na tekstylnym sączku grzybnię suszono w 105°C przez 3 godziny. Po tym czasie suchą masę ważono przy użyciu elektronicznej wagi laboratoryjnej.

3.5. Wzrost grzybni i proces biotransformacji w warunkach stresu oksydacyjnego

3.5.1. Pomiary aktywności oddechowej grzybni *C. pannorum* w warunkach stresu oksydacyjnego

Grzybnię *C. pannorum* uzyskaną z 48 godzinnej hodowli odważano w ilości 1 g. Następnie przenoszono ją do zlewek płaskodennych (100 ml)

zawierających 50 ml wysyconego tlenem 0,05 M buforu fosforanowego o pH=6 z dodatkiem związku utleniającego *t*BOOH i 1% glukozy. Pomiaru szybkości zużycia tlenu dokonywano przy pomocy kalibrowanej elektrody tlenowej będącej na wyposażeniu bioreaktora Jupiter 2.0 Multi (firmy Solaris). Wartość stężenia O₂ odczytywano w odstępach 2 minutowych. W badaniu wykorzystano różne stężenia wodoronadtlenku *tert*-butylu (0,07-1,4%), oraz zbadano wpływ czasu inkubacji grzybni z tym związkiem (0-120 minut) na jej aktywność oddechową. Próba kontrolna zawierała grzybnię zawieszoną w buforze z dodatkiem glukozy (bez *t*BOOH).

3.5.2. Wpływ różnych stężeń wodoronadtlenku *tert*-butylu na proces biotransformacji β -pinenu

Grzybnię *C. pannorum* wyhodowaną w ciągu 24 godzin poddawano następnie 24 godzinnej inkubacji w warunkach stresu oksydacyjnego w postaci różnych stężeń *t*BOOH (0,0042-0,07%). Otrzymaną grzybnię przemyto płynem fizjologicznym i użyto w procesie biotransformacji.

3.5.3. Określenie wpływu czasu inkubacji w warunkach stresu oksydacyjnego na wzrost grzybni i wydajność procesu biotransformacji β -pinenu

W doświadczeniu użyto stężenie *t*BOOH (0,007%) i wykorzystano jako czynnik stresu oksydacyjnego działający na wyhodowaną uprzednio 24 godziną grzybnię w czasie 0-24 godzin. Równolegle prowadzono hodowlę kontrolną, do której nie dodawano czynników stresowych. Następnie grzybnię przepłukano jałowym płynem fizjologicznym i użyto w procesie biotransformacji. Dynamikę procesu biotransformacji po stresie oksydacyjnym przeprowadzono w czasie od 12 do 60 godzin. Wszystkie warianty biotransformacji (3.5.2-3.5.4) wykonywano w trzech powtórzeniach.

4. Analiza wyników

4.1. Aktywność oddechowa grzybni *C. pannorum* w warunkach stresu oksydacyjnego

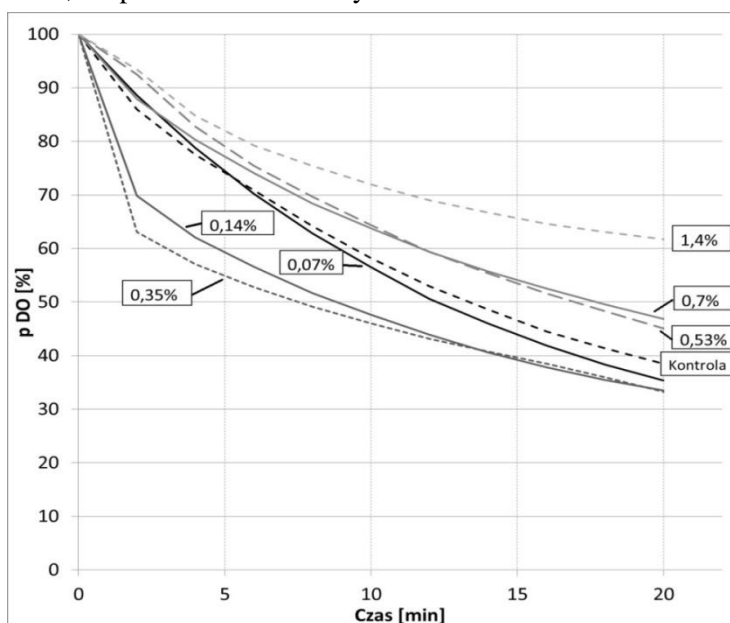
Doświadczenie miało na celu określenie takiego stężenia wodoronadtlenku *tert*-butylu i czasu inkubacji z tym związkiem, jakie powodowały wyraźny spadek aktywności oddechowej grzybni, ale nie hamowały jej całkowicie.

Grzybnia *C. pannorum* poddana stresowi oksydacyjnemu przy niższych stężeniach (0,07-0,35%) użytego *t*BOOH odznaczała się przyspieszonym

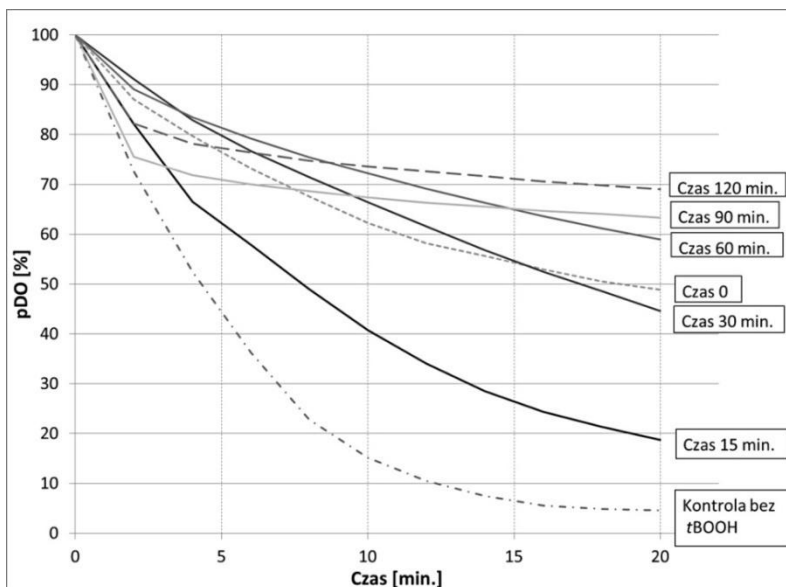
zużyciem tlenu. Mogło to być spowodowane indukcją odpowiedzi komórkowej na niezbyt silny stres. Natomiast wyższe stężenia tego związku (0,53-1,4%) powodowały spowolnienie tempa zużycia tlenu. Wynikało to z dużej toksyczności użytego stresora, którego rozkład mógł powodować powstanie uszkodzeń grzybni. Do dalszego etapu wybrano stężenie *t*BOOH wynoszące 0,7%

Grzybnia *C. pannorum* inkubowana w różnym czasie z 0,7% wodoronadtlenku *tert*-butylu wykazywała niższą aktywność oddechową w stosunku do kontroli. Czynniki stresowe dodany bezpośrednio przed pomiarem (czas 0) powodował znaczne osłabienie tempa oddychania grzybni w stosunku do tej, która była inkubowana w czasie 15 i 30 minut. Prawdopodobnie grzybnia w tym czasie adaptowała się do warunków stresowych. Stres oksydacyjny (związany z toksycznością *t*BOOH) oddziałujący na grzybnię w czasie 60-120 minut powodował dalszy spadek aktywności oddechowej grzybni. Grzybnia poddana najdłuższej inkubacji w warunkach stresu oksydacyjnego (120 minut) zachowała zaledwie 33% aktywności oddechowej w stosunku do kontroli.

Porównanie szybkości spadku zawartości tlenu przy zastosowaniu różnych stężeń *t*BOOH oraz różnego czasu inkubacji z tą substancją o stężeniu 0,7% przedstawiono na Rysunki 1 i 2.



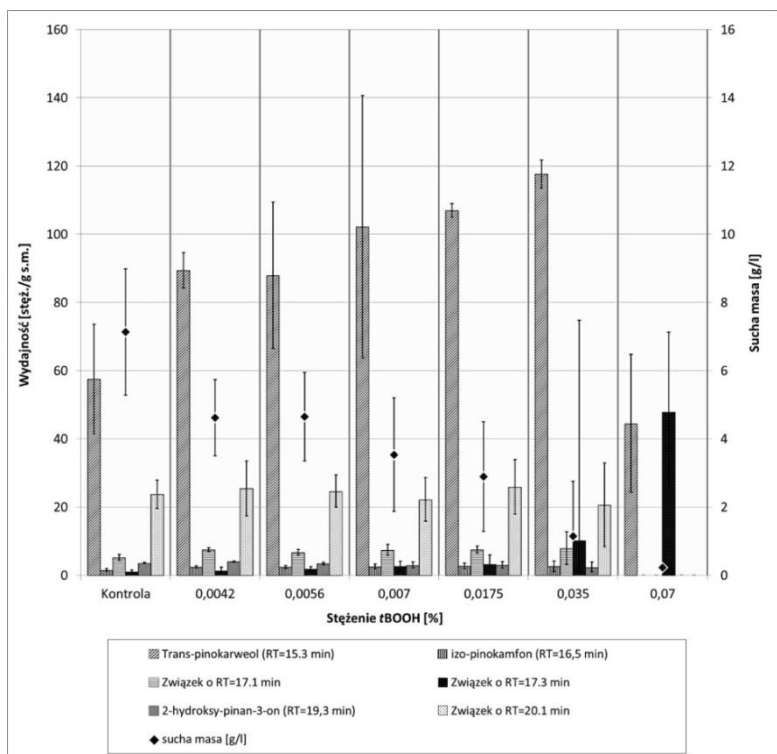
Rysunek 1. Aktywność oddechowa grzybni *C. pannorum* mierzona tempem zużycia tlenu w obecności różnych stężeń *t*BOOH. (hodowla 48h, temp. 20°C; 150 obr/min.)



Rysunek 2. Wpływ czasu inkubacji grzybnicy *C. pannorum* w warunkach stresu oksydacyjnego (dodatek 0,7% *t*BOOH) na tempo jej oddychania. (hodowla 48h, temp. 20°C; 150 obr./min.)

4.2. Wpływ stężenia wodoronadtlenku *tert*-butylu na wzrost grzybnicy i proces biotransformacji β -pinenu

Określono wpływ różnych stężeń *t*BOOH na wzrost grzybnicy *C. pannorum*, oraz wydajność biotransformacji β -pinenu. Jako kryterium wyboru odpowiedniego stężenia związku indukującego stres oksydacyjny przyjęto taką jego koncentrację, która umożliwiła spadek około 50% biomasy i zwiększenie wydajności biotransformacji β -pinenu w stosunku do kontroli. Stężeniem spełniającym to kryterium był dodatek 0,007% wodoronadtlenku *tert*-butylu, którego zastosowanie zwiększyło wydajność biotransformacji o 50%. Próby z dodatkiem wyższego stężenia stresora (0,0175 i 0,035%) odznaczały się zbyt niską biomasa, nie wystarczającą do przeprowadzenia biotransformacji. Wyniki zestawiono na Rysunku 3.



Rysunek 3. Wpływ różnych stężeń wodoronadtlenku *tert*-butylu na proces biotransformacji β -pinenu przy użyciu grzybni *C. pannorum*

Warunki prowadzenia procesu biotransformacji:

- hodowla 24h, temp. 20°C; 150 obr/min
- inkubacja z tBOOH 24 h, temp. 20°C; 150 obr/min
- 1% β -pinen
- biotransformacja 48 h, temp. 20°C; 160 obr/min

Stres oksydacyjny, wywołany związkami chemicznymi tworzącymi RFT, takimi jak nadtlenek wodoru i wodoronadtlenek *tert*-butylu, powoduje obniżenie szybkości wzrostu grzybów nitkowatych, ich sucha masa jest niższa od tej kontrolnej, co zostało zaobserwowane w pracach poświęconych tej tematyce [10, 11]. Efekt ten spowodowany jest głównie zmianą metabolizmu grzybni w kierunku uruchomienia mechanizmów przeciwdziałających stresowi, kosztem wzrostu biomasy.

4.3. Określenie wpływu czasu inkubacji w warunkach stresu oksydacyjnego na wzrost grzybni i wydajność procesu biotransformacji β -pinenu

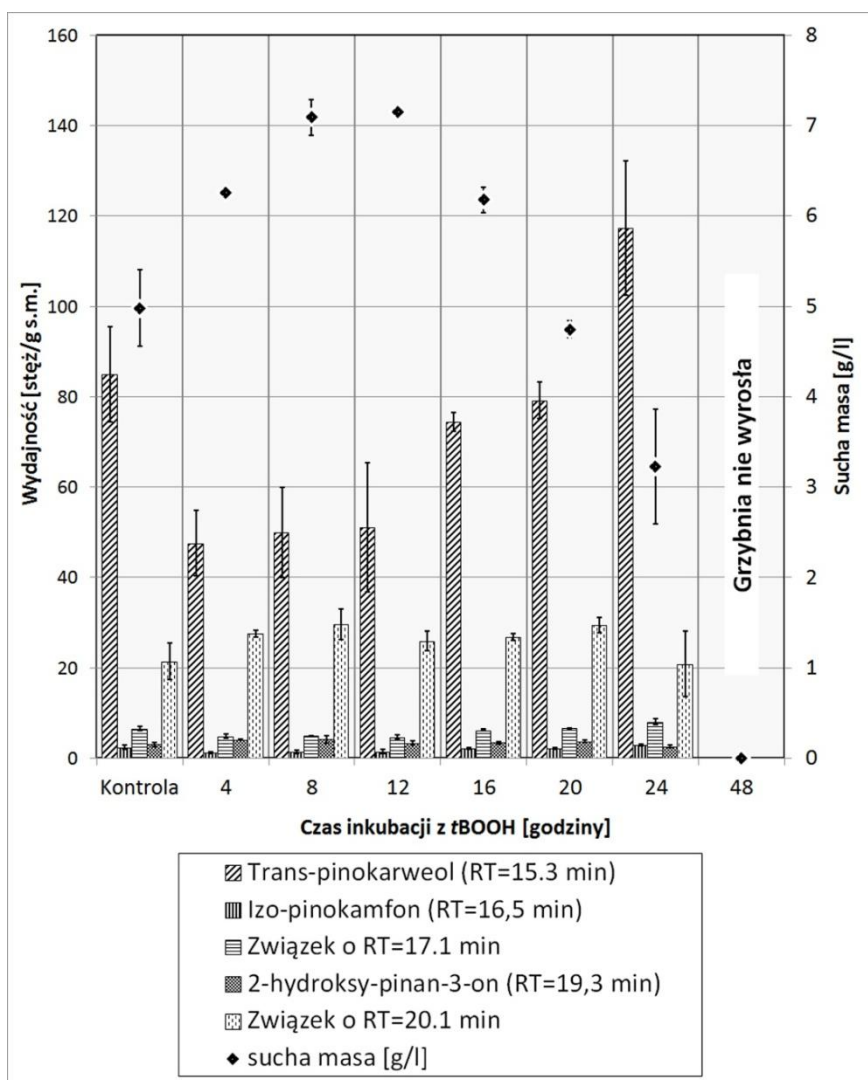
W doświadczeniu użyto optymalne stężenie *t*BOOH (0,007%) i wykorzystano jako czynnik stresu oksydacyjnego działający na grzybnię *C. pannorum* w różnym czasie inkubacji (4-24 godzin). Wykonano również próbę poddaną stresowi bezpośrednio po zaszczepieniu inokulum (48 godzin), jednak wzrost grzybni został całkowicie zahamowany. Zastosowanie krótszych czasów inkubacji w warunkach stresowych (4-16 godzin) zwiększyło ilość biomasy grzybni, co jednak nie przełożyło się na wzrost wydajności biotransformacji. Najwyższą wydajność procesu biokonwersji β -pinenu w przeliczeniu na 1 gram suchej masy uzyskano po inkubacji w warunkach stresu oksydacyjnego w czasie 24 godzin, uzyskując 1,3-krotny wzrost w stosunku do kontroli bez stresu (Rysunek 4).

Warunki prowadzenia procesu biotransformacji:

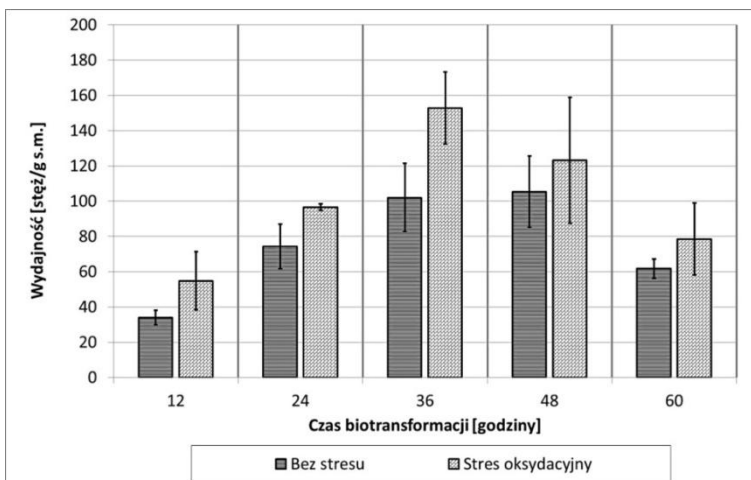
- hodowla 24h, temp. 20°C; 150 obr/min
- inkubacja z 0,007% *t*BOOH 4-48 h, temp. 20°C; 150 obr/min
- 1% β -pinen
- biotransformacja 48 h, temp. 20°C; 160 obr/min

Oddziaływanie stresora na mikroorganizm, powoduje zmiany w jego metabolizmie, zwiększając lub obniżając aktywność enzymów. Dowodzą tego badania przeprowadzone na mutantach *A. niger* 13/36 zdolnych do biosyntezy inulinazy. Mutanty wyhodowane w warunkach stresów abiotycznych wykazywały nawet 4,5-krotnie wyższą aktywność inulinazy w porównaniu ze szczepem rodzicielskim [16].

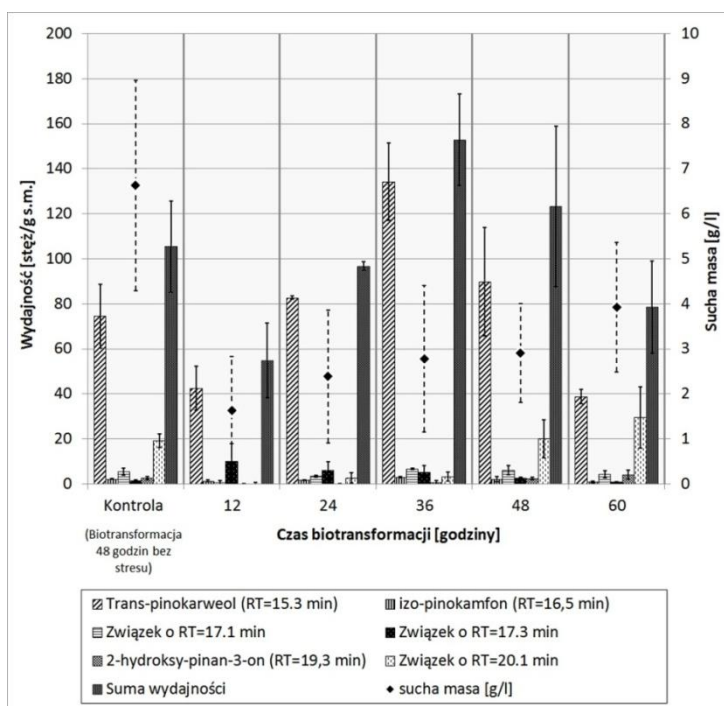
W kolejnym etapie badań stresu oksydacyjnego określono optymalny czas biotransformacji β -pinenu. Grzybnia hodowana przez 24 godziny, a następnie poddana 24 godzinnemu stresowi oksydacyjnemu (0,007% wodoronadtlenek *tert*-butylu), została użyta do procesu biotransformacji trwającego 12-60 godzin. Najwyższą wydajnością grzybnia odznaczała się po 36 godzinach biotransformacji. W tych warunkach uzyskano wydajność głównego produktu *trans*-pinokarweolu wynoszącą 134 mg w przeliczeniu na 1 g suchej masy grzybni, co stanowiło 1,8-krotny wzrost w stosunku do kontroli (biotransformacja 48 h bez stresu). Rysunek 5 i 6 przedstawiają zależności zaobserwowane w tym doświadczeniu.



Rysunek 4. Wpływ różnego czasu inkubacji grzybnia *C. pannorum* z tBOOH na proces biotransformacji β -pinenu



Rysunek 5. Porównanie sumarycznej wydajności procesu biotransformacji uzyskanej w warunkach kontrolnych bez stresu i w obecności stresu oksydacyjnego w postaci 0,007% tBOOH



Rysunek 6. Wpływ czasu biotransformacji na jej wydajność po inkubacji grzybni *C. pannorum* w warunkach stresu oksydacyjnego

Warunki prowadzenia procesu biotransformacji:

- hodowla 24h, temp. 20°C; 150 obr/min
- inkubacja z 0,007% *t*BOOH 24 h, temp. 20°C; 150 obr/min
- 1% β -pinen
- biotransformacja 12-60 h, temp. 20°C; 160 obr/min

Czynniki stresowe powodują zmiany w aktywności enzymatycznej mikroorganizmów wykorzystywanych w biotechnologii. Badania przeprowadzone m.in. w Zakładzie Mikrobiologii Przemysłowej UMCS potwierdzają możliwość wykorzystania takiego zabiegu w biotechnologii z pozytywnym skutkiem. Dodanie 1,2M NaCl do 6h hodowli konidiów *Aspergillus niger* inicjujące stres osmotyczny pozwoliło uzyskać 2,8-krotny wzrost aktywności enzymu katalazy w porównaniu z hodowlą kontrolną bez czynnika stresowego [19]. Inkubacja komórek *S. cerevisiae* przez 40 min w obecności 0,7M NaCl pozwoliła zwiększyć biosyntezę glicerolu 3-krotnie [20]. Rekombinowane szczepy drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w warunkach właściwie zastosowanego stresu oksydacyjnego prawie 2-krotnie zwiększyły syntezę α -amylazy z równoczesnym przyrostem biomasy [21]. W produkcji heterologicznych białek przy użyciu drożdży *Pichia pastoris* często stosuje się niskie wartości pH (około 3,0), co w przypadku pozyskiwania rekombinowanego chymotrypsynogenu B pozwoliło zwiększyć produktywność białka o 250% [22]. Grzyb *C. pannorum* użyty w tej pracy w warunkach stresu pH o wartości 2 i 10 wykazywał odpowiednio 1,4 i 1,5-krotny przyrost wydajności werbenonu i werbenolu w przeliczeniu na 1 g biomasy w procesie biokonwersji α -pinenu [23].

Trans-pinokarweol jest składnikiem olejku eterycznego pozyskiwanego z dębu jedwabnego, który stosowany jest w aromaterapii [24]. Jako czysty preparat związek ten wykorzystywany jest jako atraktant niektórych owadów, np. spuszczela pospolitego [25].

Wpływ czynników stresowych na biotransformację terpenoidów jest jak dotąd bardzo słabo poznany. Poszerzenie wiedzy na temat wpływu różnych warunków stresowych na hodowlę grzybni *C. pannorum* i wydajność biotransformacji β -pinenu pozwoli zoptymalizować ten proces i zwiększyć jego efektywność na dalszych etapach badań.

5. Wnioski

Zastosowany podczas hodowli czynnik stresowy (wodoronadtlenek *tert*-butylu) ma negatywny wpływ na wzrost grzybni *C. pannorum*, a użyty w większych stężeniach powodował całkowite jego zahamowanie.

Grzybnia *C. pannorum* w warunkach stresu oksydacyjnego (przy niższych stężeniach tj. 0,07-0,35% *t*BOOH) charakteryzowała się Przyspie-

szonym zużyciem tlenu. Natomiast wyższe stężenia tego związku (0,53-1,4%) powodowały spowolnienie tempa zużycia tlenu w stosunku do kontroli.

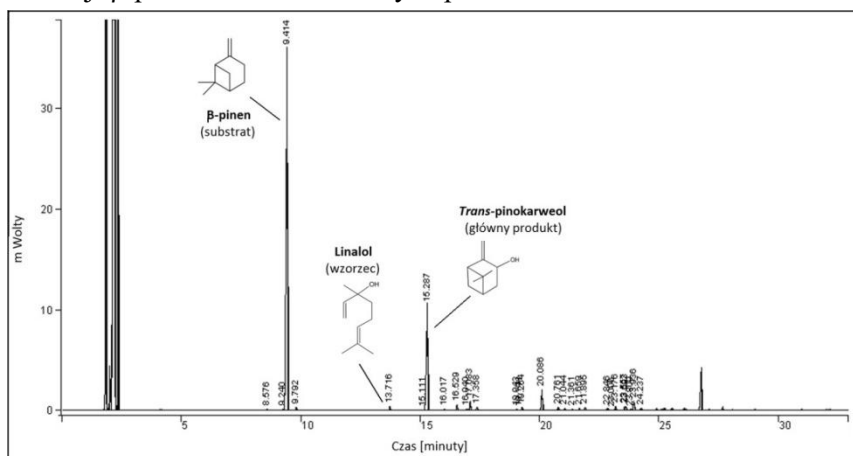
W warunkach stresowych wywołanych dodatkiem 0,7% *t*BOOH grzybnia wykazywała spowolnione tempo zużycia tlenu w stosunku do kontroli (głównie w czasie 0 oraz po inkubacji trwającej powyżej 30 minut).

Jako optymalne stężenie stresora do hodowli grzybni przyjęto 0,007% wodorodotlenku *tert*-butylu.

Optymalny czas inkubacji w warunkach stresowych wynosił 24 godziny.

W optymalnych warunkach (po 24 godz. inkubacji w stresie i 36 godz. biotransformacji β -pinenu), uzyskano 134 mg głównego produktu *trans*-pinokarweolu w przeliczeniu na 1 g suchej masy grzybni, co stanowiło około 1,8-krotny wzrost w porównaniu do kontroli, a sumaryczna wydajność biotransformacji (głównych produktów) w warunkach stresowych przewyższała ją 1,45-krotnie.

Stężenia *trans*-pinokarweolu uzyskiwane pomimo warunków stresowych, oscylowały w okolicach 360 – 480 mg/l (w zależności od hodowli), co wskazuje, że grzyb *C. pannorum* jest wydajnym biokatalizatorem konwersji β -pinenu do wartościowych produktów.



Rysunek 7. Przykładowy chromatogram analizy GC uzyskanych produktów biotransformacji β -pinenu

Uwagi ogólne

Praca finansowana z Badań Statutowych – Młodzi Naukowcy.

Literatura

1. Breitmaier E. *Terpenes: Importance, General Structure, and Biosynthesis*. (2006), WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
2. Adaszyńska-Skwirzyńska M., Swarczewicz M. *Skład chemiczny i aktywność biologiczna lawendy lekarskiej*, Wiadomości chemiczne., 68 (2014), s. 11-12
3. De Carvalho C.C.C.R., Da Fonseca M.M.R. *Biotransformation of terpenes*, Biotechnology Advances., 24(2006), s.134-142
4. Trytek M., Paduch R., Fiedurek J., Kandefler-Szerszeń M. *Monoterpeny – stare związki, nowe zastosowania i biotechnologiczne metody ich otrzymywania*, Biotechnologia., 1/76 (2007), s. 135-155
5. Agrawal R., Joseph R. *Bioconversion of alpha pinene to verbenone by resting cells of Aspergillus niger*, Applied Microbiology and Biotechnology., 53(2000), s. 335-337
6. Kashi F.J., Fooladi J., Bayat M. *The use of biotechnology for the production of flavor and fragrance*, Biotechnology., 7 (2008), s. 194-199
7. Russell N.J., Kogut M., Kates M. *Phospholipid biosynthesis in the moderately halophilic bacterium Vibrio costicola during adaptation to changing salt concentrations*, Journal of general microbiology., 131 (1985), s. 781-789
8. Robinson C.H. *Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi*, New Phytologist., 151 (2001), s. 341-353
9. Lushchak V.I. *Adaptive response to oxidative stress: bacteria, fungi, plants and animals*, Comparative Biochemistry and Physiology, Part C., 153 (2011), s. 175-190
10. Bartosz G. *Druga twarz tlenu*, (2009) Warszawa, PWN
11. Li Q., McNeil B., Harvey L.M. *Adaptive response to oxidative stress in the filamentous fungus Aspergillus niger B1-D*, Free Radical Biology & Medicine., 44 (2008), s. 394-402
12. Angelova M.B., Pashova S.B., Spasova B.K., Vassilev S.V., Slokoska L.S. *Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat*, Mycological Research., 109(2) (2005), s. 150-158
13. Alonso-Monge R., Román E., Arana D.M., Pla J., Nombela C. *Fungi sensing environmental stress*, Clinical Microbiology and Infection., 15/1 (2009), s. 17-19
14. Leiter E., González A., Erdei E., Casado C., Kovács L., Ádám C., Oláh J., Miskei M., Molnar M., Farkas I., Hamari Z., Ariño J., Pócsi I., Dombrádi V. *Protein phosphatase Z modulates oxidative stress response in fungi*, Fungal Genetics and Biology., 49 (2012), s. 708-716
15. Beales N., *Adaptation of microorganism to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review*, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety., 3 (2004), s. 1-20
16. Skowronek M., Fiedurek J. *Selection of biochemical mutants of Aspergillus niger resistant to some abiotic stresses with increased inulinase production*, Journal of Applied Microbiology, 95 (2003), s. 686-692
17. Trytek M., Jędrzejewski K., Fiedurek J. *Bioconversion of α -pinene by a novel cold-adapted fungus Chrysosporium pannorum*, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology., 42 (2015), s. 181-188

18. Trytek M., Fiedurek J. *A novel psychrotrophic fungus, Mortierella minutissima, for D-limonene biotransformation*, Biotechnology Letters., 27 (2005), s. 149-153
19. Fiedurek J. *Production of Aspergillus niger catalase under various stress conditions*, Acta Microbiologica Polonica., 49 (2000), s. 43-49
20. Omori T., Kiyoshi O., Umemoto Y., Yuki K., Kajihara Y., Shimoda M., Wada H. *Enhancement of glycerol production by brewing yeast (Saccharomyces cerevisiae) with heat shock treatment*, Journal of Fermentation and Bioengineering., 82 (1996), s. 187-190
21. Martinez J.L., Meza E., Petranovic D., Nielsen J. *The impact of respiration and oxidative stress response on recombinant α -amylase production by Saccharomyces cerevisiae*, Metabolic Engineering Communications., 3 (2016), s. 205-210
22. Curvers S., Brixius P., Klauser T., Thömmes J., Weuster-Botz D., Takors R., Wandrey C. *Human chymotrypsinogen B production with Pichia pastoris by integrated development of fermentation and downstream processing. Part 1*, Biotechnology Progress., 17 (2001), s. 495-502
23. Trytek M., Fiedurek J., Gromada A. *Effect of some abiotic stresses on the biotransformation of α -pinene by a psychrotrophic Chrysosporium pannorum*, Biochemical Engineering Journal., 112 (2016), s. 86-93
24. Fraternali D., Giamperi L., Bucchini A., Ricci D. *Essential oil composition and antioxidant activity of aerial parts of Grindelia robusta from Central Italy*, Fitoterapia., 78 (2007), s. 443-445
25. Fettköther R., Reddy G.V.P., Noldt U., Dettner K. *Effect of host and larval frass volatiles on behavioural response of the old house borer, Hylotrupes bajulus (L.) (Coleoptera Cerambycidae), in a wind tunnel bioassay*, Chemoecology., 10 (2000), s. 1-10

Wpływ stresu oksydacyjnego na biotransformację β -pinenu przy użyciu psychrotroficznego grzyba *Chrysosporium pannorum*

Streszczenie

Procesy metaboliczne mikroorganizmów w dużej mierze zależą od warunków środowiska. Drobnoustroje wykształciły wiele mechanizmów oporności na stres i wszystkie te przystosowania mają określone cechy wspólne. Zatem można przypuszczać, że niektóre z nich ewoluowały z jednego mechanizmu oporności, który wraz z pojawianiem się nowych czynników stresowych ulegał drobnym zmianom. Poznanie mechanizmów adaptacyjnych do określonych stresów może zminimalizować ich negatywne skutki, a nawet przyczynić się do zwiększenia wydajności syntetyzowanych przez drobnoustroje ważnych metabolitów. Komórki wystawione na jeden rodzaj stresora stają się odporne na szerokie spektrum niekorzystnych czynników. W warunkach stresu mikroorganizmy wykorzystywane do biotransformacji terpenów (np. β -pinenu) mogą wykazywać nowe cechy w przekształcaniu tych substratów do wartościowych produktów.

Celem tej pracy było określenie wpływu stresu oksydacyjnego na tempo oddychania grzybni, oraz wydajność biotransformacji β -pinenu przy zastosowaniu psychrotroficznego szczepu *Chrysosporium pannorum*. Grzybnię wyrosłą w ciągu 24-godzin na podłożu optymalnym poddano działaniu stresu oksydacyjnego w postaci wodoronadtlenku *tert*-

butylu (*t*BOOH), następnie wykorzystano w procesie biotransformacji β -pinenu. Otrzymane produkty terpenowe analizowano za pomocą GC-MS.

Przeprowadzone doświadczenia dowiodły, że wodoronadtlenek *tert*-butylu ma negatywny wpływ na wzrost grzybni *C. pannorum*, powodując spowolnienie, a w większych stężeniach całkowite jego zahamowanie. W warunkach 24 godz. inkubacji z 0,007% *t*BOOH i biotransformacji β -pinenu w ciągu 36 godz. uzyskano wydajność głównego produktu *trans*-pinocarweolu wynoszącą 134 mg w przeliczeniu na 1 g suchej masy grzybni, co stanowi 1,8-krotny wzrost w stosunku do kontroli.

Analiza otrzymanych wyników przyczyni się do lepszego poznania mechanizmów działania czynników stresowych na proces biotransformacji.

Słowa kluczowe: biotransformacja, β -pinen, stres oksydacyjny, psychrotrofy

The influence of oxidative stress on the biotransformation of β -pinene by the psychrotrophic fungus *Chrysosporium pannorum*

Abstract

Metabolic processes of microorganisms largely depend on environmental conditions. Microorganisms developed many mechanisms of resistance to stress, and all of these adaptations have certain specific features in common, which may result from the fact that they have evolved from one resistance mechanism which has been modified over time. Cells exposed to one type of stressor become resistant to a wide range of adverse factors. Under conditions of stress, microorganisms may show new properties in the biotransformation of the terpene substrates (e.g., β -pinene) into valuable products.

The aim of this study was to determine the effect of oxidative stress on the rate of mycelium respiration and the efficiency of biotransformation of β -pinene by the psychrotrophic strain *Chrysosporium pannorum*. The mycelium was grown for 24 hours in an optimal medium, then was exposed to oxidative stress in the form of *tert*-butyl hydroperoxide (*t*BOOH), and next used in the biotransformation of β -pinene. The resulting terpene products were analysed by GC-MS.

Performed experiments showed that *tert*-butyl hydroperoxide had a negative effect on the growth of *C. pannorum* mycelium, at higher concentrations causing a complete its inhibition. Under the conditions of 24-h incubation with 0.007% *t*BOOH followed by 36-h biotransformation of β -pinene, the yield of the major product, *trans*-pinocarveol, reached 134 mg per 1 g dry weight of mycelium, which represented a 1.8-fold increase relative to the control.

Analysis of the obtaining results will contribute to a better understanding of the action of stress factors on the biotransformation process.

Keywords: biotransformation, β -pinene, oxidative stress, psychrotrophs

Wpływ wybranych ftalocyjanin na komórki drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

1. Wstęp

1.1. Charakterystyka ftalocyjanin

Ftalocyjaniny (tetraazabenzoporfiryny) są syntetycznymi związkami organicznymi, o budowie zbliżonej do naturalnie występujących porfiryn. Cztery pierścienie izoindolowe, połączone mostkami azametinowymi, tworzą płaską strukturę z 18 zdelokalizowanymi elektronami. Związki te posiadają interesujące właściwości spektralne i fotochemiczne.

Ftalocyjaniny, pod wpływem promieniowania o długości fali ok. 340 nm oraz w przedziale 600-800 nm, mają zdolność generowania rodników. Reakcja może przebiegać według dwóch mechanizmów, w zależności od dostępności tlenu w środowisku: typ I (rodnikowy) – przy małym stężeniu tlenu i typ II (generowanie tlenu singletowego) przy dużym stężeniu tlenu [1-7].

W przypadku, kiedy w środowisku jest duże stężenie tlenu, reakcja fotochemiczna zachodzi według mechanizmu typu II. Wzbudzona ftalocyjanina reaguje wówczas z tlenem, dzięki czemu generowany jest tlen singletowy ¹O₂. Wszystkie powstające formy tlenu są bardzo reaktywne – mają silnie utleniające właściwości, które mogą być wykorzystywane w katalizie, czy medycynie.

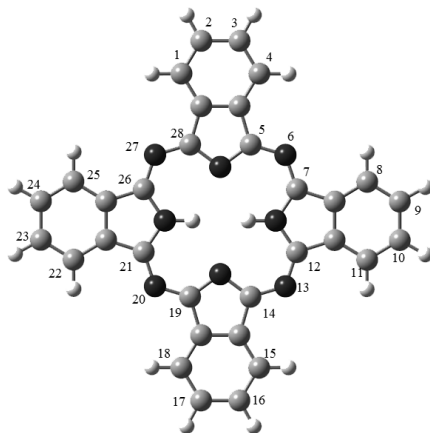
Cenną właściwością ftalocyjanin jest także łatwość ulegania licznym reakcjom, np.: tworzeniu kwasów, zasad i soli, reakcjom redoks, polimeryzacji, agregacji, katalizie oraz sorpcji, przy czym w wyżej wymienionych reakcjach, mogą brać udział peryferyjne części pierścienia: pozycje 1-4, 8-11, 15-18 i 22-25 lub część centralna (rys. 1), gdzie najczęściej zachodzi koordynacja jonu metalu [1-7].

Ze względu na układ zawierający 18 zdelokalizowanych elektronów π , pierścień ftalocyjaninowy jest ligandem chelatowym, tworzącym trwałe kompleksy. Ftalocyjaniny w zależności od jonu centralnego, mogą przybierać różne struktury molekularne. Wyróżnia się strukturę płaską, gdy jon centralny położony jest w płaszczyźnie pierścienia ftalocyjaninowego,

¹ kjoncz@gmail.com, Zakład Chemii Ogólnej, Wydział Chemii, Uniwersytet Opolski

² Zakład Chemii Ogólnej, Wydział Chemii, Uniwersytet Opolski, www.chemia.uni.opole.pl

strukturę wypukłą, gdy jon centralny wysunięty jest ponad płaszczyznę pierścienia, strukturę sandwiczową, jon metalu łączy dwa, ułożone równolegle ligandy ftalocyjaninowe oraz strukturę dwurdzeniową, w której biorą udział więcej niż dwa ligandy koordynowane przez jony metalu. Ponadto, cząsteczki ftalocyjanin mogą być modyfikowane różnymi podstawnikami, które mogą wpływać na zmianę ich właściwości fizykochemicznych. Na przykład podstawienie pierścienia grupami alkilowymi lub aryłowymi, nie zmienia znacznie rozpuszczalności ftalocyjanin, podczas gdy podstawienie grupami aminowymi, sulfonowymi czy karboksylowymi może nadać cząsteczce właściwości hydrofilowe [1, 8, 9].



Rysunek1. Budowa cząsteczki ftalocyjaniny [opracowanie własne]

1.2. Oddziaływania w układzie rozpuszczalnik–ftalocyjanina–komórka

Dobór odpowiedniego rozpuszczalnika w badaniach biologicznych jak i chemicznych ma istotne znaczenie. Nie każdy rozpuszczalnik jest odpowiedni dla wybranego mikroorganizmu, ze względu na swoje właściwości fizyczne i chemiczne. Najogólniejszym podziałem rozpuszczalników jest klasyfikacja według momentu dipolowego substancji. Rozpuszczalniki mające zerowy lub bardzo mały moment dipolowy są niepolarne, podczas gdy rozpuszczalniki posiadające znaczny elektryczny moment dipolowy są polarne.

W przypadku ftalocyjanin rodzaj użytego rozpuszczalnik ma duży wpływ na położenie pasm absorpcyjnych w widmie UV-Vis. Na przykładzie ftalocyjaniny kobaltu wykazano, że gdy rozpuszczalnikiem jest silny kwas, czyli ma „swobodne” protony – atomy azotu w pozycjach 6,

13, 20, 27 (rys.1) ulegają protonowaniu i ma miejsce silne batochromowe przesunięcie pasma Q (tzw. „czerwone”), w kierunku fal dłuższych [10, 11].

Wiele rozpuszczalników działa toksycznie na komórki drobnoustrojów. Dla określenia toksyczności rozpuszczalników organicznych, stosuje się współczynnik podziału w układzie n-oktanol – woda ($\log P_{ow}$). Rozpuszczalniki organiczne z $\log P_{ow}$ 1 – 5 są toksyczne dla mikroorganizmów. Zdolność cząsteczki rozpuszczalnika do rozmieszczania się w fazie wodnej i w błonie komórek, jest bardzo istotna w przypadku rozpuszczalników niepolarnych ($\log P_{ow} > 5$). Nie wykazują one szkodliwego wpływu na aktywność metaboliczną u kilku gatunków bakterii. W przypadku łatwo mieszających się z wodą rozpuszczalników organicznych, takich jak alkohole o krótkim łańcuchu (na przykład, metanol, etanol, 1-propanol), toksyczność koreluje bezpośrednio z ich hydrofobowością [12, 13].

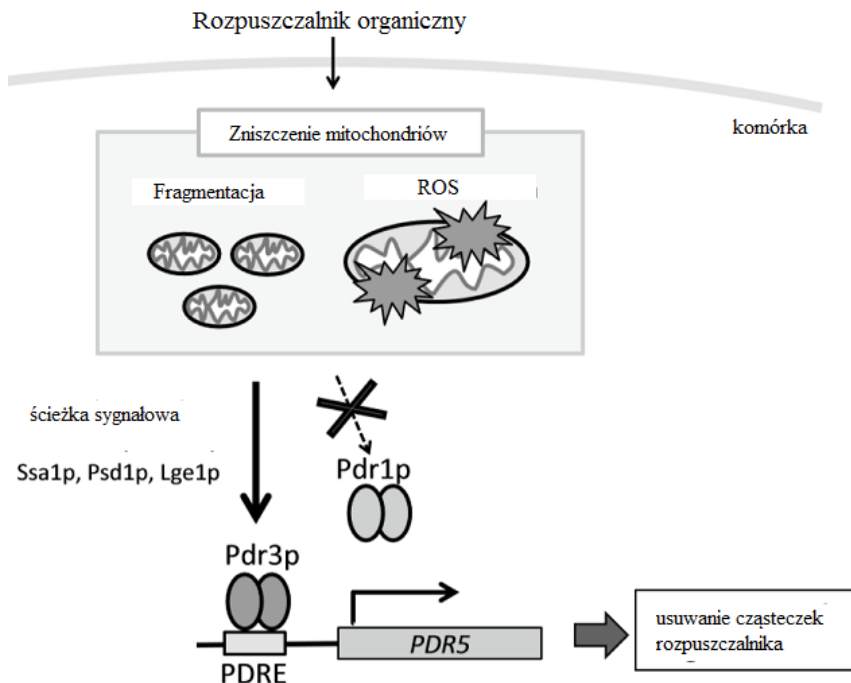
Nagromadzenie cząsteczek rozpuszczalników w błonie niszczy bariery błony – zwiększa przepuszczalność, co upośledza przekazywanie energii przez rozpraszanie potencjału błony i powoduje dysfunkcje białek błonowych, takie jak zaburzenia transportu i sygnalizacji, a ostatecznie doprowadza do śmierci komórki [14, 15]. Tolerancja rozpuszczalników organicznych (Organic Solvent Tolerance – OST) u bakterii Gram-ujemnych jest ściśle związana ze składem kwasów tłuszczowych w błonie komórkowej, oraz z systemem oporności wielolekowej i z odpowiedzią komórkową wywołaną czynnikiem stresowym. Wykryto 12 genów, które są odpowiedzialne za wyżej wymienione mechanizmy: *FabR*, *fadR*, *fabB*, *ACRR* *Mara*, *Marr*, *Beti*, *gcvA*, *SLT*, *cadB*, *cadM*, *andyhID*, *ThefabR* i *fadR* – geny, które regulują biosyntezę kwasów tłuszczowych i *fabB* gen, który bezpośrednio uczestniczy w syntezie kwasów tłuszczowych [16].

Błona cytoplazmatyczna jest głównym miejscem działania rozpuszczalników organicznych. Stosując 1,2,3,4-dihydronaftalen (tetralina), wykazano spadek potencjału błonowego. Efekt ten przypisano zwiększonej przepuszczalności błon komórkowych dla H^+ . Równocześnie zaobserwowano zatrzymanie wzrostu inkubowanych w obecności rozpuszczalnika bakterii. Ponadto, wykazano, że węglowodory cykliczne, zmieniają gradient pH i potencjał elektrochemiczny błon. Etanol wpływa na siłę napędową pompy protonowej, w efekcie czego pojawia się wyciek metabolitów z komórek [17].

Wzrost, jest tylko jednym z wielu wskaźników stanu fizjologicznego komórek bakteryjnych *E. coli*, podczas inkubacji w obecności niskich stężeń etanolu. Wykazano, że przy stężeniu 5% (v/v), etanol powoduje zatrzymanie wzrostu kolonii oraz ma niekorzystny wpływ na syntezę ściany komórkowej [18]. Wykazano również zmniejszenie sieciowania peptydoglikanu, ponieważ enzymy sieciujące mogą być hamowane przez obecność etanolu. To zahamowanie wzrostu, może być złagodzone przez

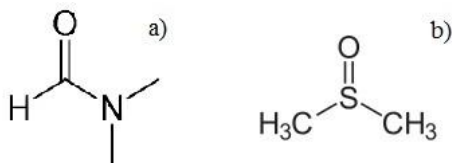
rozcieńczanie ze świeżym medium. W przeciwieństwie do etanolu, 1-propanol powoduje, że efekt jest nieodwracalny, doprowadzając do śmierci komórek [12].

Inne badania wykazały, że rozpuszczalniki organiczne uszkadzają mitochondria komórkowe poprzez ich fragmentację oraz tworzenie reaktywnych form tlenu. Uruchomiony szlak sygnałowy (zwiększenie ekspresji genu *Pdr5p*) ułatwia dostosowanie komórki do niekorzystnych warunków środowiska, usuwając na zewnątrz cząsteczki rozpuszczalnika (rys. 2). Rozpuszczalniki organiczne stanowią jednak duży problem dla komórki, doprowadzając często do programowanej śmierci czyli apoptozy [17, 19].



Rysunek 2. Schemat ścieżki sygnałowej aktywowanej przez cząsteczki rozpuszczalnika organicznego. Po zniszczeniu mitochondriów aktywowany jest szlak genu *Pdr3p*, w efekcie czego następuje zwiększenie ekspresji genu *Pdr5p* i usuwanie cząsteczek rozpuszczalnika na zewnątrz, na podstawie [17].

Wśród rozpuszczalników organicznych, najpopularniejsze w badaniach komórkowych, w których wykorzystywane są ftalocyjaniny, są *N,N*-dimetyloformamid (DMF) oraz dimetylosulfotlenek (DMSO) (rys.5), mimo, że wykazują toksyczność wobec większości mikroorganizmów (DMF: $\log P_{ow} = -1,01$; DMSO: $\log P_{ow} = -1,35$) [20-23].



Rysunek 3. a) N,N-dimetyloformamid, b) dimetylosulfotlenek [opracowanie własne]

2. Cel pracy

Celem pracy było zbadanie wpływu ftalocyjanin cynku, cyny i iterbu rozpuszczonych w Tween 80 na komórki *S. cerevisiae* szczep W303 oraz *S. cerevisiae* szczep F87 oraz zbadanie wpływu rozpuszczalników DMF i Tween 80 na wzrost komórek szczepów tych drożdży.

3. Część eksperymentalna

3.1. Materiały

3.1.1. Mikroorganizmy

Do badań wybrano dwa szczepy: *S. cerevisiae* W303 oraz *S. cerevisiae* F87.

3.1.2. Stosowane podłoża hodowlane

Do badań stosowano podstawowe płynne podłoże hodowlane YPG. Posiewy punktowe prowadzono na podłożach stałych, o tym samym składzie, z dodatkiem agaru.

3.1.3. Badane ftalocyjaniny

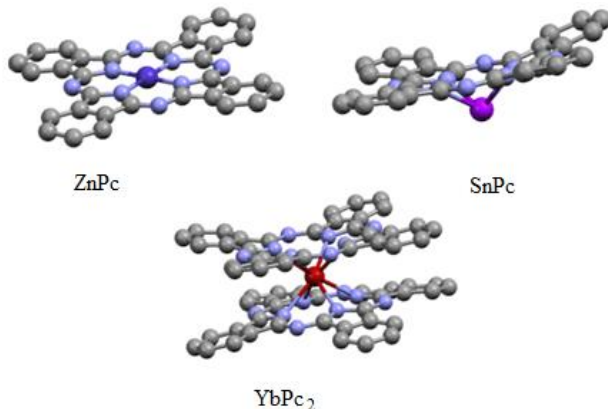
W badaniach wykorzystano ftalocyjaniny cynku (ZnPc), cyny (SnPc), oraz iterbu (YbPc₂) otrzymane wg metody opracowanej w Zakładzie Chemii Ogólnej Uniwersytetu Opolskiego [24]. Stosowane rozpuszczalniki to N,N-dimetyloformamid (DMF) oraz monooleinian polioksyetylenosorbitolu (Tween 80) dostarczone przez Sigma Aldrich.

3.2. Metody

3.2.1. Wpływ rozpuszczalnika DMF oraz Tween 80 na wzrost komórek *S. cerevisiae*

Wpływ rozpuszczalnika badano dodając odpowiednią jego ilość do hodowli składającej się z 2 ml odpowiedniego podłoża oraz 10 μ l inokulum. Hodowle z rozpuszczalnikiem inkubowano przez 48 h

w temperaturze 30°C, a następnie wykonywano posiewy punktowe na agarowych podłożach stałych. Dokonywano oceny wzrostu kolonii w zależności od ilości dodanego związku.



Rysunek 4. Wzory strukturalne badanych ftalocyjanin

3.2.2. Wpływ wybranych ftalocyjanin na wzrost komórek *S. cerevisiae*

Wpływ wybranych ftalocyjanin na wzrost komórek *S. cerevisiae* badano dodając wyznaczoną ilość roztworu ftalocyjaniny cynku o stężeniu 432 $\mu\text{mol/l}$, ftalocyjaniny cyny o stężeniu 476 $\mu\text{mol/l}$ oraz ftalocyjaniny iterbu o stężeniu 209 $\mu\text{mol/l}$ do 2 ml podłoża i 10 μl inokulum. Prowadzono trzy rodzaje hodowli z ftalocyjaninami:

- Hodowla nienaświetlana (kontrolna)
- Hodowla naświetlana promieniowaniem o długości fali 366 nm przez 60 minut natychmiast po dodaniu ftalocyjaniny,
- Hodowla naświetlana 60 minut promieniowaniem o $\lambda = 366$ nm po 24 h inkubacji z ftalocyjaniną.
- Hodowle prowadzono przez 48 h, a następnie wykonywano posiewy punktowe na agarowych podłożach stałych. Dokonywano oceny wzrostu kolonii w zależności od ilości dodanego związku.

4. Wyniki

4.1. Wpływ badanych rozpuszczalników

Na podstawie wykonanych posiewów potwierdzono doniesienia naukowe, że rozpuszczalnik DMF wykazuje działanie hamujące wzrost komórek *S. cerevisiae* W303 oraz F87. Bardziej wrażliwy okazał się szczep W303. Zahamowanie wzrostu nastąpiło przy stężeniu DMF 64,6 $\mu\text{mol/l}$. W przypadku *S. cerevisiae* F87 – 97 $\mu\text{mol/l}$.

Tabela 1. Wpływ DMF na wzrost komórek *S. cerevisiae* W303


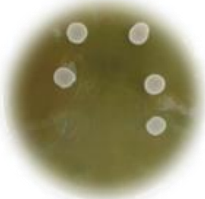
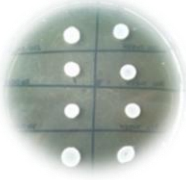
| Stężenie DMF w hodowli [$\mu\text{mol/l}$] | Hodowla <i>S. cerevisiae</i> W303 z DMF | Stężenie DMF w hodowli [$\mu\text{mol/l}$] |
|--|---|--|
| 6,4 |  | kontrola |
| 32,3 | | 16,1 |
| 97 | | 64,6 |
| - | | 129,2 |

Tabela 2. Wpływ DMF na wzrost komórek *S. cerevisiae* F87.

| Stężenie DMF w hodowli [$\mu\text{mol/l}$] | Hodowla <i>S. cerevisiae</i> F87 z DMF | Stężenie DMF w hodowli [$\mu\text{mol/l}$] |
|--|---|--|
| 6,4 |  | kontrola |
| 32,3 | | 16,1 |
| 97 | | 64,6 |
| - | | 129,2 |

W przypadku Tween 80 – nie wykazano działania hamującego wzrost komórek w zakresie stężeń do 324 $\mu\text{mol/l}$, co daje 17% objętościowych.

Tabela 3. Wpływ Tween 80 na wzrost komórek *S. cerevisiae* W303 i F87

| Szczep W303 | Hodowla <i>S. cerevisiae</i> z Tween 80 | Szczep F87 |
|---|---|---|
| Stężenie Tween 80 w hodowli [$\mu\text{mol/l}$] | | Stężenie Tween 80 w hodowli [$\mu\text{mol/l}$] |
| 202 |  | 202 |
| 243 | | 243 |
| 283 | | 283 |
| 324 | | 324 |

W związku z powyższym, do badań wpływu ftalocyjanin na wzrost komórek drożdży *S. cerevisiae* stosowano roztwory ftalocyjanin w Tween 80.

4.2. Wpływ badanych ftalocyjanin

4.2.1. Hodowle bez naświetlania

Hodowle prowadzone bez naświetlania, traktowano jako hodowle kontrolne wobec badania aktywności fotochemicznej ftalocyjanin. Na przykładzie komórek *S. cerevisiae* poddanych działaniu ftalocyjanin rozpuszczonych w Tween 80 wykazano, że związki te nie wywierają wpływu na wzrost komórek. W tabelach 4 – 8 przedstawiono posiewy punktowe dwóch szczepów *S. cerevisiae* z ftalocyjaniną cynku, ZnPc/Tween 80, ftalocyjaniną cyny, SnPc/Tween 80 oraz diftalocyjaniną iterbu, YbPc₂/Tween 80.

Tabela 4. Wpływ ZnPc/Tween 80 bez naświetlania na komórki *S. cerevisiae*, po 48 h hodowli


| Szczep F87 | Hodowla <i>S. cerevisiae</i> z ZnPc/Tween80 | Szczep W303 |
|----------------------------------|--|----------------------------------|
| Stężenie ZnPc w hodowli [μmol/l] | | Stężenie ZnPc w hodowli [μmol/l] |
| 54 |  | 54 |
| 64,8 | | 64,8 |
| 75,6 | | 75,6 |
| 86,4 | | 86,4 |

Tabela 5. Wpływ SnPc/Tween 80 bez naświetlania na komórki *S. cerevisiae* F87, po 48 h hodowli.

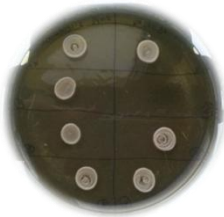
| Stężenie SnPc w hodowli [μmol/l] | Hodowla <i>S. cerevisiae</i> F87 z SnPc/Tween 80 | Stężenie SnPc w hodowli [μmol/l] |
|----------------------------------|---|----------------------------------|
| kontrola z 324 μmol/l Tween 80 |  | kontrola |
| 190 | | - |
| 140 | | 24 |
| 95 | | 47 |

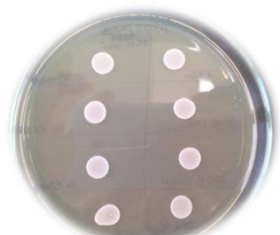
Tabela 6. Wpływ SnPc/Tween 80 bez naświetlania na komórki *S. cerevisiae* W303, po 48 hodowli

| Stężenie SnPc w hodowli [$\mu\text{mol/l}$] | Hodowla <i>S. cerevisiae</i> W303 z SnPc/Tween80 | Stężenie SnPc w hodowli [$\mu\text{mol/l}$] |
|---|---|---|
| kontrola z 324 $\mu\text{mol/l}$ Tween 80 |  | kontrola |
| 190 | | - |
| 140 | | 24 |
| 95 | | 47 |

Tabela 7. Wpływ YbPc₂/Tween 80 bez naświetlania na komórki *S. cerevisiae* F87, po 48 h hodowli.

| Stężenie YbPc ₂ w hodowli [$\mu\text{mol/l}$] | Hodowla <i>S. cerevisiae</i> F87 z YbPc ₂ /Tween80 | Stężenie YbPc ₂ w hodowli [$\mu\text{mol/l}$] |
|--|---|--|
| kontrola z 324 $\mu\text{mol/l}$ Tween 80 |  | kontrola |
| 83,5 | | 140 |
| 63 | | 14 |
| 42 | | 21 |

Tabela 8. Wpływ YbPc₂/Tween 80 bez naświetlania na komórki *S. cerevisiae* W303, po 48 h hodowli.

| Stężenie YbPc ₂ w hodowli [$\mu\text{mol/l}$] | Hodowla <i>S. cerevisiae</i> W303 z YbPc ₂ /Tween 80 | Stężenie YbPc ₂ w hodowli [$\mu\text{mol/l}$] |
|--|---|--|
| kontrola z 324 $\mu\text{mol/l}$ Tween 80 |  | kontrola |
| 84 | | 140 |
| 63 | | 14 |
| 42 | | 21 |

Z powyższych danych wynika, że zarówno ftalocyjaniny, jak i Tween 80 nie ograniczają wzrostu komórek w optymalnych warunkach hodowli.

4.2.2. Wpływ ftalocyjanin na komórki *S. cerevisiae* po naświetlaniu

Prowadzono dwa rodzaje hodowli komórkowych: naświetlane przez 60 min promieniowaniem o długości fali 366 nm natychmiast po dodaniu ftalocyjanin (t_0) oraz naświetlane po 24 h inkubacji z ftalocyjaniną. Nie zaobserwowano różnic w kondycji kolonii. W tabelach 9 – 11 przedstawiono wyniki posiewów punktowych hodowli *S. cerevisiae* z ftalocyjaninami rozpuszczonymi w Tween 80.

Tabela 5. Wyniki posiewów punktowych hodowli *S. cerevisiae* W303 i F87 z ZnPc/Tween 80.

| szczep | Naświetlanie hodowli z ZnPc w t_0 | | Naświetlanie hodowli po 24 h inkubacji z ZnPc | |
|-------------------|-------------------------------------|-----|---|-----|
| | W303 | F87 | W303 | F87 |
| Stężenie [μmol/l] | | | | |
| 54 | | | | |
| 65 | | | | |
| 76 | | | | |
| 86 | | | | |
| kontrola | | | | |

Tabela 10. Wyniki posiewów punktowych hodowli *S. cerevisiae* W303 i F87 z SnPc/Tween 80

| szczep | Naświetlanie hodowli z SnPc w t_0 | | Naświetlanie hodowli z SnPc po 24 h inkubacji | |
|---|-------------------------------------|-----|---|-----|
| | W 303 | F87 | W 303 | F87 |
| Stężenie [$\mu\text{mol/l}$] | | | | |
| 24 | | | | |
| 48 | | | | |
| 95 | | | | |
| 142 | | | | |
| 190 | | | | |
| kontrola | | | | |
| Kontrola z 324 $\mu\text{mol/Tween 80}$ | | | | |

Tabela 11. Wyniki posiewów punktowych hodowli *S. cerevisiae* W303 i F87 z YbPc₂/Tween 80

| szczep stężenie [μmol/l] | Naświetlanie hodowli z YbPc ₂ w t ₀ | | Naświetlanie hodowli z YbPc ₂ po 24 h inkubacji | |
|-----------------------------------|--|------|---|-----|
| | W 303 | F 87 | W 303 | F87 |
| 10 | | | | |
| 21 | | | | |
| 42 | | | | |
| 62,7 | | | | |
| 83,5 | | | | |
| 104 | | | | |
| Kontrola z 324 μmol/l Tween 80 | | | | |
| kontrola | | | | |

5. Podsumowanie i wnioski

Na podstawie przeglądu literaturowego dokonano analizy wpływu ftalocyjanin oraz odpowiednich dla nich rozpuszczalników na komórki mikroorganizmów. Zbadano wpływ, otrzymanych w Zakładzie Chemii Ogólnej Uniwersytetu Opolskiego, ftalocyjanin cynku, cyny i iterbu na komórki drożdży *Saccharomyces cerevisiae*.

Badane związki – ftalocyjanina cynku, cyny oraz iterbu charakteryzują się dużą hydrofobowością, co uniemożliwia dodawanie ich bezpośrednio do medium hodowlanego – roztworu wodnego. Dlatego w badaniach, do rozpuszczenia cząsteczek, stosowane są rozpuszczalniki organiczne, które

niestety nie są obojętne dla komórek mikroorganizmów. Najczęściej stosowane – N,N-dimetyloformamid (DMF) oraz Tween 80 zbadano pod względem hamującego działania na wzrost komórek *S. cerevisiae* W303 oraz F87. Rozpuszczalnikiem, który do stężenia 324 $\mu\text{mol/l}$ nie wpływa na zahamowanie wzrostu komórek jest monooleinian polioksyetylenosorbitolu (Tween 80).

Badania wpływu ftalocyjanin bez naświetlania, potwierdzają fakt iż ftalocyjaniny, aby były aktywne, muszą zaabsorbować promieniowanie o odpowiedniej długości fali. Jeśli nie jest to możliwe, cząsteczki ftalocyjanin nie są w stanie doprowadzić do utworzenia rodników tlenowych i w efekcie wprowadzone do hodowli komórkowej nie wywierają żadnego wpływu na znajdujące się tam komórki. Przedstawione w pracy doświadczenia z trzema ftalocyjaninami: cynku (ZnPc), cyny (SnPc) oraz iterbu (YbPc₂) wprowadzonymi do hodowli komórkowej *S. cerevisiae* nie wykazały aktywności ftalocyjanin. W każdym przypadku, kolonie komórkowe były w dobrej kondycji, intensywne, o regularnych kształtach w badanym zakresie stężeń.

Naświetlane ftalocyjanin promieniowaniem o długości fali $\lambda=366$ nm, wiąże się z reakcją fotochemiczną, czyli z wytworzeniem reaktywnych form tlenu (RFT). Ftalocyjaniny jako cząsteczki hydrofobowe mają zdolność włączania się w błony komórkowe. Jeśli tam zachodzi reakcja fotochemiczna, utlenione zostają fosfolipidy błonowe, zmieniają się właściwości fizykochemiczne błony, komórka zostaje uszkodzona i włączane są mechanizmy apoptozy bądź nekrozy, doprowadzając komórkę do śmierci. Dlatego, rozpatrując celowe niszczenie komórek, ftalocyjaniny są odpowiednimi związkami. W przeprowadzonych badaniach stosowano dwa układy. Pierwszy, kiedy naświetlano hodowlę natychmiast po dodaniu ftalocyjaniny, oraz drugi, kiedy naświetlano po 24 godzinnej inkubacji komórek z badanym związkiem. Okazało się, że badane ftalocyjaniny nie hamują wzrostu drożdży: ani po natychmiastowym naświetlaniu ani po naświetlaniu poprzedzonym 24 godzinną inkubacją z badanymi związkami.

Literatura

1. Kadish K., Guillard R., Smith K. *Phthalocyanines: Properties and Materials*, The Porphyrin Handbook, (17) 2002
2. Trytek M., Makarska M., Radzki S., Fiedurek J., Polska K. *Porfiryny i ftalocyjaniny, Cz.1. Właściwości i niektóre zastosowania*, Biotechnologia, 4 (71) 2005, s. 109-127
3. Hamblin M. R. *Antimicrobial Photodynamic Therapy and Photodynamic Inactivation or Killing Bugs with Dyes and Light*, Photochemistry and Photobiology, 88 (4) 2012, s. 496-498

4. Castano A. P., Demidova T. N., Hamblin M. R. *Mechanism in Photodynamic Therapy: past one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization*, Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 1 (2004), s. 279-293
5. Castano A. P., Demidova T. N., Hamblin M. R. *Mechanism in Photodynamic Therapy: part two – cellular signaling, cell metabolism and models of cell death*, Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2 (2005), s. 1-23
6. Castano A. P., Demidova T. N., Hamblin M. R. *Mechanism in Photodynamic Therapy: part three – photosensitizer, pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and models of tumor destruction*, Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2 (2005), s. 91-106
7. Calzavara-Pinton P., Salla R., Venturini M., Rossi T. *Photodynamic Antifungal Chemotherapy*, Photochemistry and Photobiology, 88 (2012), s. 512-522
8. Chernonosow A. A., Ermilov E. A., Roder B., Solovyova L. I., Fedorova O. S. *Effects of Some Substituents Increasing The Solubility Zn(II) and Al(III) Phthalocyanines on Their Photophysical Properties*, Bioinorganic Chemistry and Application, 7 (2014), s. 1-7
9. Sakamoto K., Ohno - Okumura E. *Synthesis and Functional Properties of Phthalocynines*, Materials, 2 (2009), s. 1127-1179
10. Ghani F., Kristen J., Riegler H. *Solubility Properties of Unsubstituted Metal Phthalocyanines in Different Types of Solvents*, Journal of Chemical and Engineering Data, 57 (2012), s. 439-449
11. Kaya E. C., Karadeniz H., Koca A., Kahriman E., Sokmen A. *Synthesis and Antimicrobial Activity of New Phthalocyanine Complexes and Electrochemical and Spectroelectrochemical Behaviour of Cobalt Phthalocyanine*, Journal of Chemical Research, Nov (2012), s. 665-671
12. Ankarloo J., Wikman S., Nichols I. A. *Escherihia coli mar and acrAB Mutants Display No Tolerance to Simple Alcohols*, International Journal of Molecular Sciences, 11 (2010), s. 1403-1412
13. Perpina C., Vinaixa J., Andreu C., del Olmo M. *Development od New Tolerant strains to Hydrophilic and Hydrophobic Organic Solvents by the Yeast Surface Display Methodology*, Applied Genetics and Molecular Biotechnology, 99 (2015), s. 775-789
14. Ramos J. L., Duque E., Gallegos M. T., Godoy P., Ramos-Gonzalez M., Rojas A., Teran I., Segura A. *Mechanism of Solvent Tolerance in Gram-negative Bacteria*, Annual Rewiev of Microbiology, 6 (2002), s. 743-768
15. Sikkema J., de Bont J. A., Poolman B. *Mechanism of Membrane Toxicity of Hydrocarbons*, Microbiology Rewiev, 59 (1995), s. 201-222
16. Oh H. Y., Lee J. O., Kim O. B. *Increase of Organic Solvent Tolerance of Escherichia coli by the Deletion of Two Regular Genes, fadR and marR*, Applied Microbiology and Biotechnology, 96 (2012), s. 1619-1627
17. Nishida-Aoki N., Mori H., Kuroda K., Ueda M. *Activation of the Mitochondrial Signaling Pathway in Response to Organic Solvent Stress in Yeast*, Current Genetics, 61 (2015), s. 153-164
18. Fried V. A., Novick A. *Organic Solvents as a Probes for the Structure and Function of the Bacterial Membrane: Effects of Ethanol onn the Wild Type*

- and an Ethanol-resistant mutant of *Escherichia coli* K-12, *Journal of Bacteriology*, 114 (1973), s. 239-248
19. Taylor M., Ramond J.-B., Tuffin M., Burton S., Eley K., Cowan D. *Mechanisms and Applications of Microbial Solvent Tolerance*, *Microbiology Monographs*, 22, s. 177-208
 20. Ghammamy S., Azimi M., Sedaghat S. *Preparation and identification of two new phthalocyanines and study of their anti-cancer activity and anti-bacterial properties*. *Scientific Research and Essays*, 74 (2012), s. 3751-3757.
 21. Soncin M., Fabris C., Busetti A., Dei D., Nistri D., Roncucci G., Jori G. *Approaches to selectivity in the Zn(II)-phthalocyanine photosensitized inactivation of wild-type and antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus**. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 1 (2002), s. 815-819
 22. Seven O., Bircan D., Sohret A., Feriha C. *Synthesis, properties and photodynamic activities of some zinc(II) phthalocyanines against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus**, *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 12 (2008), s. 953-963
 23. Spesia MB., Rovera M., Durantini EN. *Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* and *Streptococcus mitis* by cationic zinc(II) phthalocyanines in media with blood derivatives*, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45 (2010), s. 2198-2205
 24. Słota R. *Praca doktorska*, Politechnika Warszawska, 1995

Wpływ wybranych ftalocyjanin na komórki drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

Streszczenie

Zbadano wpływ ftalocyjanin cynku, cyny i iterbu, rozpuszczonych w Tween 80 na dwaszczepydrożdży: *Saccharomyces cerevisiae* F87 oraz W303. Określono wpływ rozpuszczalników DMF oraz Tween 80 na wzrost komórek tych szczepów. Stwierdzono, że DMF ma toksyczny wpływ na komórki, natomiast Tween 80 jest obojętny w badanym zakresie stężeń. Wyniki badań wpływu ftalocyjanin na wzrost badanych szczepów drożdży wskazują, że zarówno bez aktywacji światłem jak i naświetlane promieniowaniem w zakresie UV, w stosowanych zakresach stężeń, nie działają toksycznie.

Słowa kluczowe: *S. cerevisiae*, toksyczność, ftalocyjaniny

The impact of selected phthalocyanines on the *Saccharomyces cerevisiae* yeast cell

Abstract

The effect of zinc, tin, and ytterbium phthalocyanine complexes dissolved in Tween 80 was studied in order to estimate their potential to suppress the growth of *Saccharomyces cerevisiae* F87 and W303 yeast strains. Preliminary tests excluded DMF from the investigation since it was found toxic for the studied microorganisms, whereas Tween 80 proved non-toxic at all. Research on the effect of the applied phthalocyanines upon microorganisms growth has indicated that they are not toxic within the explored concentration range. This applies both to the conditions without and under illumination by UV light.

Keywords: *S. cerevisiae*, toxicity, phthalocyanines

Wpływ wybranych mikotoksyn na zdrowie zwierząt i sposoby ich eliminacji z pasz

1. Wprowadzenie

Mikotoksyny są to trujące produkty przemiany materii różnych rodzajów grzybów strzępkowych, które to stanowią produkt uboczny w procesach metabolicznych lub też mogą służyć w celach obronnych [1]. Pod względem chemicznym mikotoksyny są zaliczane do węglowodorów aromatycznych o małej masie cząsteczkowej, co wpływa na ich znaczną oporność na czynniki środowiskowe oraz na brak właściwości immunogennych [2]. Stanowią realne zagrożenie dla zdrowia człowieka oraz zwierząt ze względu na swoje właściwości rakotwórcze, toksyczne, mutagenne lub teratogenne. Znanych jest kilkaset mikotoksyn, które są tworzone głównie przez pleśnie rodzaju *Aspergillus*, *Fusarium* i *Penicillium*. Do zanieczyszczeń tymi toksynami, może dojść w każdym momencie, od rozwoju roślin na polu, przez zbiór, do obróbki, przechowywania i transportu gotowego produktu [3]. Wnikanie mikotoksyn do organizmu może odbywać się przez naturalne wrota, np. jamę ustną, układ oddechowy, skórę, a ich szkodliwy efekt może uwidocznić się na dwa sposoby [4]. Mogą to być występujące rzadko ostre zatrucia, spowodowane spożyciem w paszy trujących metabolitów pleśni w bardzo wysokiej dawce, lub przewlekłe stany chorobowe zwierząt, wywołane niewielkimi dawkami toksyn w dłuższym czasie [5]. Produkcja mikotoksyn jest to naturalny proces, który występuje w królestwie grzybów. Zdolność ta jest charakterystyczna dla organizmów pasożytniczych i saprofitycznych.

Mikotoksyny, będące metabolitami wtórnymi grzybów, porażają płody rolne, które wykorzystywane na pasze stanowią realne zagrożenie dla zwierząt. Toksyny te mogą być produkowane zarówno w czasie wegetacji na polu, jak i w czasie przechowywania i przetwarzania zbóż, i często zależą od warunków środowiskowych występujących w otoczeniu składowanych surowców.

Najważniejsze pod względem ekonomicznym oraz toksykologicznym w skali europejskiej i światowej jest pięć mikotoksyn: aflatoksyna,

¹ daniel18-1994@wp.pl, StudenckieKoło Naukowe Inżynierii Rolniczej, Wydział Przyrodniczy, Uniwersytet Przyrodniczo- Humanistyczny w Siedlcach

ochratoksyna A, deoksyniwalenol, zearalenon i fumonizyna. Mikotoksyny te są tworzone przez grzyby toksynotwórcze, które są obecne jako składnik mikroflory gleby, płodów rolniczych i ogrodniczych. Z powodu na częste występowanie, wymienione mikotoksyny uznane zostały za metabolity grzybów, najczęściej zanieczyszczające płody rolne oraz pasze. Ich spożycie powoduje mikotoksykozy, czyli choroby, które u zwierząt gospodarskich powodują m.in. uszkodzenia i nowotwory wątroby w przypadku aflatoksyn, uszkodzenia wątroby przez ochratoksyny A, zaburzenia płodności przez zearalenon oraz wymioty i utratę łaknienia po przez spożycie z paszadeoksyniwalenolu, co prowadzi do spadku wykorzystania paszy i przyrostów zwierząt [6]. Objawy zatrucia mikotoksynami są na ogół podobne do zatruc pestycydami oraz metalami ciężkimi i zależą od dawki spożytej toksyny, czasu działania oraz stanu zdrowia zwierzęcia. Przyjmuję się że, długotrwałe narażenie na działanie mikotoksyn jest najbardziej niebezpieczne dla zdrowia i życia zwierząt, natomiast ostre zatrucia ukazują najbardziej wyraźne objawy ich działania. Ważną kwestią jest również to, że do zatrucia tymi toksynami może dojść nie tylko przez przewód pokarmowy, ale również w skutek inhalacji lub poprzez wystawianie skóry na powietrze oraz pyły zawierające mikotoksyny [7, 17].

2. Cel pracy i metodyka

Celem pracy jest przedstawienie najważniejszych mikotoksyn występujących w paszach, czynników powodujących ich powstawanie, negatywnego wpływu na zdrowie zwierząt oraz sposobów ich usuwania. Praca powstała na podstawie przeglądu aktualnej literatury, zarówno krajowej jak i zagranicznej.

3. Najczęściej występujące mikotoksyny w paszach

3.1. Aflatoksyny

Aflatoksyny wywoływane są przez grzyby z gatunków *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus*. Są to bardzo powszechnie występujące grzyby zarówno w glebie, magazynach i w przechowywanych tam materiałach paszowych. Grzyby te występują obficie w ziarnie zbóż, soi, kukurydzy, które później przeznaczone są na pasze. Uważało się, że toksyny te powstawały jedynie w czasie przechowywania, jednak stwierdzono je również już podczas wegetacji [1]. Metabolity tych grzybów zostały oznaczone literami: B₁, B₂, M₁ i M₂, G₁, G₂. Ich nazwy pochodzą od barwy światła jakie emitują pod wpływem promieniowania UV. Aflatoksyna B emituje światło barwy niebieskiej, aflatoksyna G emituje barwę zieloną, natomiast aflatoksyna M została odkryta w mleku ssaków, od czego pochodzi jej nazwa. Aflatoksyny są przyczyną wielu różnych chorób, takich jak aflatoksykozy występujących zarówno u zwierząt

hodowlanych, domowych jak i ludzi. Występowanie aflatoksyn zależy od niektórych czynników środowiskowych, dlatego poziom skażenia może być różny zależnie od regionu geograficznego oraz warunków uprawy. Nie bez znaczenia jest również podatność surowców roślinnych na zakażenie grzybami zarówno podczas uprawy, przechowywania i przetwarzania. Aflatoksyny wzbudzają największą uwagę wśród wszystkich mikotoksyn, ponieważ badania na zwierzętach laboratoryjnych wykazały ich działanie rakotwórcze [7]. Toksyną bardzo niebezpieczną i wytwarzaną w dużych ilościach jest aflatoksyna B₁. Górna granica zawartości aflatoksyny B₁ w paszach, zalecana przez Światową Organizację Zdrowia, wynosi 20 µg/kg paszy. W Żywności przeznaczanej bezpośrednio dla człowieka aflatoksyny nie powinny być obecne w wykrywalnych ilościach (praktycznie zawartość ich powinna być niższa od 0,1 µg/kg) [6]. Aflatoksyny są toksyczne dla zarodków i płodów zwierząt. Mają właściwości cytotoksyczne i już w małych ilościach powodują obniżenie odporności organizmu. Dodatkowo, występowanie aflatoksyn w paszy powoduje zmniejszenie przyrostów zwierząt, wzrostem spożycia paszy na jeden kilogram przyrostu oraz wzrostem chorób i upadków w stadzie. Ze wszystkich odkrytych mikotoksyn to właśnie aflatoksyny są najgroźniejsze w żywieniu bydła i owiec. Przedostają się do mleka i powodują zatrucia już u młodych osobników, przyczyniając się do ich dużej śmiertelności. Dodatkowo, występujące w paszach aflatoksyny mogą powodować ostre zapalenia wymienia oraz zahamowanie pracy żywca. U świń najbardziej podatne na zatrucia aflatoksynami są prosięta, u których w wyniku spożycia zanieczyszczonych pasz występuje spadek odporności organizmu i podatność na infekcje. Również występowanie aflatoksyn w paszy dla drobiu, wiąże się z wystąpieniem anoreksji w stadzie i spadkiem wyników produkcyjnych [8].

3.2. Ochratoksyna A

Z względów ekonomicznych oraz toksykologicznych jedną z najważniejszych mikotoksyn występujących w naszym kraju jest ochratoksyna A. Ochratoksyna A jest wytwarzana przez grzyby z grupy *Aspergillus* oraz *Penicillium verrucosum*, które to występują powszechnie na przechowywanym ziarnie zbóż [9, 10]. Ma właściwości nefrotoksyczne i nefrokancerogenne [1]. Nie zaobserwowano występowania tej toksyny w czasie wegetacji, przed zbiorem zbóż w naszym klimacie. Zawartość ochratoksyny A w zbożach, zależy od ich gatunku [11]. Najbardziej wrażliwe na zainfekowanie grzybami, tworzącymi tą toksynę jest żyto, w mniejszym stopniu pszenżyto, jęczmień czy też kukurydza. Dodatkową wpływ na zawartość ochratoksyny A w paszy mają też indywidualne cechy odmianowe [6]. Zanieczyszczenia zboża glebą, nasionami chwastów oraz duża ilość nasion uszkodzonych sprzyja powstawaniu tej toksyny podczas

przechowywania. Ziarno będące bez uszkodzeń, czyste, zdrowe, posiadające odpowiednią zdolność kiełkowania ma o wiele większą odporność na zainfekowanie grzybami tworzącymi toksyny. Dodatkowo, warunki klimatyczne mają również wpływ na rozwój toksynotwórczych grzybów, które produkują tą toksynę. W klimacie ciepłym ochrotoksyna A powstaje najczęściej w ziarnie kukurydzy zanieczyszczonym przez grzyby z rodzaju *Aspergillus*, natomiast w klimacie umiarkowanym dochodzi do skażenia innych gatunków zbóż takich jak: jęczmień, żyto i owies [9]. Ochrotoksyna A podobnie jak aflatoksyny mają duże znaczenie biorąc pod uwagę zagrożenia zdrowia zwierząt i spowodowania strat w produkcji. Bezpośrednią przyczyną szkodliwości tej toksyny jest nieodwracalne uszkodzenie nefronów, mogące prowadzić do śmierci zwierzęcia. Najbardziej wrażliwe na ochrotoksynę A są świny oraz psy, a osobniki młode wykazują kilka razy większą wrażliwość. Przy podawaniu zwierzętom pasz zanieczyszczonych tą toksyną występują objawy zatrucia podostrego oraz zatrucia przewlekłego. W wyniku zatrucia następuje zmniejszenie wagi zwierząt, wzrost ilości wypijanej wody, przy spadku przyrostów dziennych, uszkodzenie prawidłowego funkcjonowania nerek i wątroby oraz szybki spadek nieśności u kur.

3.3. Zearalenon

Zearalenon produkowany jest przez grzyby z rodzaju *Fusarium*, z których *F. graminearum* i *F. culmorum* są najważniejszymi producentami tej toksyny [12]. Do gromadzenia się tej toksyny, może dochodzić już podczas wegetacji na polu w zbożu porażonym przez grzyby, jednak według wielu badań decydujący wpływ na wysoką zawartość tej toksyny w paszy ma nieprawidłowe przechowywanie surowców [13]. Jest to mikotoksyna, którą przede wszystkim zanieczyszcza ziarno zbóż, głównie kukurydzę. Zearalenon ma właściwości mutagenne oraz estrogeniczne. Toksyna ta jest najbardziej szkodliwa dla świń oraz owiec [14]. Do typowych objawów mikotoksykozy spowodowanej wysoką zawartością zearalenonu w paszy są: zmniejszenie płodności, zmiany stężenia progesteronu we krwi, wzrost śmiertelnej resorpcji embrionów, zmniejszenie wielkości jelit, czy też zmniejszenie wielkości gruczołów dokrewnych. U loch występuje powiększenie gruczołów mlecznych, stany zapalne i obrzęk pochwy i sromu oraz utrata apetytu i zahamowanie produkcji mleka dla prosiąt. U krów i owiec, które są narażone na wpływ zearalenonu występuje bezpłodność oraz spadek produkcyjności. Badania wykazały, że u bydła wypasanego na pastwiskach, gdzie trawa była skażona tą toksyną występowały poważne problemy z rozrodem stada. Wykazano również, że przeżuwacze, dzięki mikroorganizmom przewodu pokarmowego, jest w stanie zredukować negatywny wpływ i zawartość w zearalenonu w organizmie. Wpływ ostrej toksyczności tej mikotoksyny jest widoczna w wątrobie i nerkach, powodując gruczolaka wątroby oraz raka przysadki [15].

3.4. Deoksyniwalenol

Deoksyniwalenol (womitoksyna) należy do grupy Triachotecenów, metabolitów o charakterze epoksydów seskwiterpenowych [6]. Wytwarzany jest przez grzyby gatunków *Fusariumculmorom* i *F. graminearum*, na ziarnie zbóż i na chorych roślinach w czasie ich wegetacji. Często wytwarzany jest razem z zearalenonem w kolbach kukurydzy. Triachoteceny są szczególnie niebezpieczne, ponieważ mogą wnikać do organizmu zarówno przez przewód pokarmowy, przez inhalację jak i przez skórę. W wyniku wpływu tej toksyny na organizm, hamowana jest synteza DNA i RNA, a przez zablokowanie enzymu transferazy peptydowej, biorącej udział w tworzeniu łańcucha peptydowego, hamowana jest również synteza białek w rybosomach [1]. Do innych objawów spożywania w paszach tej toksyny są wymioty, podrażnienie skóry i tkanek podskórny, biegunka, występowanie krwotoków w narządach wewnętrznych, anemia, co przyczynia się do spadku masy ciała a w długotrwałym przebiegu kończy się śmiercią zwierzęcia. Badania wykazały, że drób jest bardziej narażony na zatrucia deoksyniwalenolem niż bydło, natomiast najbardziej wrażliwe na tą toksynę są zwierzęta monogastryczne, szczególnie trzoda chlewna [8, 16]. Spożycie paszy, która zawiera deoksyniwalenol wywołuje u zwierząt zaburzenia pracy jelit związane ze zmniejszeniem pobrania glukozy. Ponadto, stwierdzono również, iż toksyna ta ma właściwości immunosupresyjne, wraz ze spadkiem pobrania paszy i przyrostów dochodziło do spadku koncentracji albumin i globulin we krwi, obniżenia poziomu wapnia oraz fosforu, a także powiększenie się wątroby. Komisja Europejska w Rozporządzeniu z dnia 28 września 2007 roku, określiła najwyższe dopuszczalny poziom deoksyniwalenolu. Ustalona została również maksymalna dzienna dawka na poziomie wynoszącym 1 µg/kg masy ciała [18].

3.5. Fumonizyny

Fumonizyny stanowią grupę mikotoksyn, które występują głównie w ziarnie kukurydzy. Produkowane są pleśń z rodzajów *Fusarium*, z których najczęściej spotykane to *F. moniliforme* i *F. Proliferatum* [19]. W przeciwieństwie do pozostałych mikotoksyn, które rozpuszczają się w rozpuszczalnikach organicznych, te natomiast toksyny rozpuszczają się w wodzie, co przyczynia się do problemów w ich analizie [20]. Do zanieczyszczenia pasz dochodzi w następstwie infekcji roślin podczas pierwszych zbiorów na polu, co wywoływane jest przez różne czynniki, do których zalicza się między innymi uszkodzenia spowodowane przez owady lub też suszę [1]. Zostało poznane ponad piętnaście rodzajów fumonizyn, z których najczęściej spotykane to fumonizyna B1, fumonizyna B2 oraz Fumonizyna B3 [6]. Grzyby, które tworzą tą toksynę są endofitami kukurydzy, i występują w ziarniakach i rdzeniach kolb [21]. Do zakażeń

dochodzi najczęściej w wyniku porażenia kolb kukurydzy przez grzyby rodzaju *Fusarium*, do czego dochodzi w znacznym stopniu poprzez żerowanie szkodników, które uszkadzają okrywę nasienną. Głównym szkodnikiem żerującym na kukurydzy jest omacnica prosowianka, z którą walczyć można stosując odpowiednie pestycydy. Powoduje to zmniejszenie zawartości fumonizyn w ziarniakach kukurydzy. Ze względu na strukturę i wielkość ziarniaków kukurydzy oraz czas ich dojrzewania, udowodniono że, więcej tych toksyn akumuluje się w ziarnie kukurydzy niż innych zbóż drobnoziarnistych [22]. Fumonizyny mogą wywoływać wiele chorób zwierząt, z których najczęściej występujące to leukoencefalomalacja u koni i królików oraz obrzęk płuc u świń. Toksyny te uszkadzają również wątrobę, wpływają negatywnie na funkcjonowanie układu nerwowego i odpornościowego. Powodują także uszkodzenie funkcjonowania nerek.

4. Sposoby usuwania mikotoksyn z pasz

Usunięcie mikotoksyn z paszy jest bardzo trudne i może być przeprowadzane za pomocą metod fizykochemicznych i biologicznych. Do najnowszych metod fizykochemicznych jest degradacja za pomocą indukowanej mikrofalowej plazmy pod ciśnieniem atmosferycznym [23]. W badaniach wykazano, iż mikotoksyny zostają usunięte już po 5 sekundach po użyciu plazmy. Do chemicznych metod degradacji mikotoksyn używać można wielu związków takich jak: gazowy chlor, ozon, podchloryny sodu, czy też kwasy i zasady. Związki te prowadzą do detoksykacji aflatoksyny B1 [24]. Metody biologiczne z wykorzystaniem enzymów rozkładających mikotoksyny jest bardzo wydajne ze względu na wzrost selektywności reakcji. Innym sposobem ograniczenia negatywnego wpływu mikotoksyn jest dodawanie do paszy obojętnych suplementów, które pochłaniają toksyny z paszy lub też w przewodzie pokarmowym, dzięki czemu nie są wchłaniane do krwioobiegu i nie zatrują organizmu. Do takich absorbentów zalicza się: kaoliny, glinki, węgiel aktywny oraz glinokrzemiany sody, mogące w znacznym stopniu zmniejszyć negatywny wpływ mikotoksyn na zdrowie zwierząt [25].

5. Podsumowanie

Mikotoksyny są bez wątpienia bardzo groźnymi związkami, które w negatywnym stopniu wpływają na zdrowie zwierząt oraz wyniki produkcyjne stada. Wiedza na temat czynników jakie je wywołują, sposoby ograniczenia ich występowania powinny być celem wielu producentów i przetwórców pasz. Niestety, stosowanie dobrej praktyki rolniczej i dobrej praktyki produkcji nie spowoduje całkowitej eliminacji tych toksyn z surowców zbożowych, dlatego należy monitorować ich występowanie, co z pewnością przyczyni się do poprawy jakości pasz i wzrostu wyników produkcji zwierząt.

Literatura

1. Balas J. *Mikotoksyny jako źródło zanieczyszczeń żywności pochodzenia roślinnego*. Postępy Fitoterapii 2/2006, s. 98-104
2. Cegielska- Radziejewska R., Szablewski T., Karolczak K., Kaczmarek A., Kijowski J., *Ocena zawartości mikotoksyn w zbożach paszowych i paszach metodą immunoenzymatyczną*. NaukaPrzyrodaTechnologie 4/2009, s. 113-114
3. Scott P. M.: *Effect of food processing on mycotoxins*. J. Food Prot. 1984, 47, 489.
4. Moore-Landecker E.. *Fungi of veterinary and medical interest*. In: Fundamentals of the fungi, E. Moore-Landecker (ed.), Prentice Hall, Upper saddle River, New Jersey, 1996, s.45-82
5. Grajewski J. *Mikotoksyny i grzyby pleśniowe zagrożenia dla człowieka i zwierząt*. Wydawnictwo Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy. 2006, s. 8-21
6. Chełkowski J. *Mikotoksyny, grzyby toksynotwórcze, mikotoksykozy*. www.cropnet.pl/mycotoxin (28.11.2015)
7. Śliżewska K. *Mykotoksyny w paszy*. IndykPolski, 2008, 3/14, s.14-20
8. Selwet M. *Negatywne aspekty występowania wybranych mikotoksyn w paszach*. Wiadomości Zootechniczne, R. XLVIII (2010), 1 s. 9–13
9. Stanisławczyk R, Rudy M, Świątek B. *Występowanie mikotoksyn w zbożach i przetworach zbożowych znajdujących się w placówkach handlowych województwa podkarpackiego*. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość. 2010, 6 (73), s. 58-66
10. Pokrzywka P, Cieślik E, Topolska K. *Ocena zawartości mikotoksyn w wybranych produktach spożywczych*. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość. 2007, 3 (52), s. 139-146
11. Stolarska A, Janda K. *Zagrożenia dla zbóż- grzyby strzępkowe*. Przemysł Spożywczy 2004, 11, s. 55-58
12. Zinedine A, Rosiano J, Molto J. *Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone. A noestrogenic mycotoxin*. Food and chemical toxicology. 2007, Volume 45 s. 1-18
13. Solarska E, Kuzdraliński A, Potocka E. *Mycotoxins in cereals from organic cultivation*. Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering, 2012 Vol. 57 (4) s. 100-104
14. Seeling K, Danicke S, Lebzien P. *On the effects of Fusarium toxin-contaminated wheat and the feed intake level on the metabolism and carry over of zearalenone in dairy cows*. Food Add Contam 22 s. 847-855
15. Bayer F, Ferse I, Humpf H. *Large- scale production of selected type A trichothecenes: the use of HT-2 toxin and T-2 triol as precursors for synthesis of d3-T-2 and d3-TH-2 toxin*. Mycotox. Res. 2009, 25, s. 41-52
16. Eriksen G, Pettersson H. *Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed*. Animal Feed Science and Technology. CXIV, 2004, s.221-229
17. Dworacka- Kaszak B. *Mikrobiologia weterynaryjna*. Wydawnictwo SGGW, Warszawa, 2008, s. 145-198
18. *Deoksynivalenol i jego pochodne*. www.fusar.edu.pl (30.03.2016)
19. Binder E. *Managing the risk of mycotoxins in modern feed production*. Animal Feed Science and Technology. Nr. CXXXXXII, 2007, s.113-121
20. da Rocha M, da Chagas F, Maia F, Rondina D. *Mycotoxins and their effects on human and animal health*. Food Control, 2014, s.322-341

21. Logrieco E, Moretti A, Chełkowski J. *Natural occurrence of beauvericin in preharvest Fusarium subglutinans infected corn crops in Poland.* Journal Agriculture Food Chemistry 41 (1993), s. 2149-2152
22. Chełkowski J. *Mikotoksyny i grzyby toksynotwórcze, jako istotny wskaźnik jakości żywności i pasz.* Polskie Drobiarstwo, 10 (2008), s. 22-26
23. Park B, Takatori K, Liang Y, Zhan T, Kim I, Lee M, Han D, Cung K, Park J. *Degradation of mycotoxins using microwave-induced plasma at atmospheric pressure.* Surface and Coating Technology 201 (2007), s. 5733-5737
24. Piva G, Galvano F, Pietra A, Piva A. *Detoxification methods of aflatoxin.* Nature Res. 15 (1993), s. 767-776
25. Piotrowska M. *Wykorzystanie mikroorganizmów do usuwania mikotoksyn z żywności i pasz.* Postępy Mikrobiologii, 51 (2012), s. 109-119.

Wpływ wybranych mikotoksyn na zdrowie zwierząt i sposoby ich eliminacji z pasz

Streszczenie

Mikotoksyny będące wtórnymi produktami przemian grzybów strzępkowych, stanowią realne zagrożenie dla zdrowia wielu gatunków zwierząt. W pracy zostały opisane najczęściej występujące mikotoksyny w paszach, czyli: aflatoksyny, ochratoksyna A, zearalenon, deoksynivalenol oraz fumonizyny, a także metody ich usuwania i wpływ na zdrowie zwierząt. Artykuł powstał na podstawie przeglądu literatury polskiej oraz zagranicznej. Należy stwierdzić, że skarmianie pasz zanieczyszczonych mikotoksynami prowadzi do zatruc, które mają negatywny wpływ na pracę narządów wewnętrznych a nawet prowadzić do śmierci zwierzęcia. Bardzo częstym przejawem stosowania pasz zanieczyszczonych przez mikotoksyny jest spadek pobrania paszy, pogorszenie przyrostów oraz zaburzenia w rozrodzie stada.

Influence of selected mycotoxins on animal health and ways of their elimination from the feed

Abstract

Mycotoxins as secondary products of transformation of filamentous fungi, are a real threat to the health of many animal species. The paper described the most common mycotoxins in feed, namely: aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, deoxynivalenol and fumonisin, as well as methods for their removal and the impact on animal health. The article is based on literature review Polish and foreign. It should be noted that the feeding of feed contaminated with mycotoxins leads to poisoning, which have a negative impact on the internal organs and even lead to death. A very common manifestation of the use of feed contaminated by mycotoxins is a decrease in feed intake, impaired growth and impaired reproduction in the herd.

Zakażenia mikrobiologiczne produktów kosmetycznych

1. Wstęp

Zgodnie z aktualnym ustawodawstwem, produkt kosmetyczny, to „każda substancja lub mieszanina przeznaczona do kontaktu z zewnętrznymi częściami ciała (...) lub z zębami oraz błonami śluzowymi jamy ustnej, którego (...) głównym celem jest utrzymanie ich czystości, perfumowanie, zmiana ich wyglądu, ochrona, utrzymywanie w dobrej kondycji lub korygowanie zapachu ciała” [1]. Z założenia kosmetyk, prócz pełnienia tych funkcji, powinien być bezpieczny i pozbawiony drobnoustrojów. W rzeczywistości jednak, ze względu na swój bogaty skład, stanowi idealne środowisko do namnażania i bytowania w nim drobnoustrojów.

Zanieczyszczenie mikrobiologiczne może dotyczyć już samego etapu pozyskiwania surowców kosmetycznych od dostawcy, jak również procesu technologicznego podczas produkcji (przedostanie się patogenów z powietrza, wody, pracownika), magazynowania gotowego wyrobu czy późniejszego jego stosowania przez konsumentów. Skutkiem skażenia mikrobiologicznego kosmetyku są bardzo często zmiany fizyko-chemiczne, będące następstwem wytwarzania substancji przez drobnoustroje [2]. W tym przypadku najczęściej dochodzi do zmian organoleptycznych kosmetyku, pH czy składu chemicznego wskutek interakcji między metabolitami wytwarzanymi przez drobnoustroje a masą kosmetyczną.

Aby uzyskać produkt wolny od patogenów, należy stosować najwyższe standardy produkcji oparte o analizy mikrobiologiczne. Istotne jest w tym przypadku określenie analizy ryzyka mikrobiologicznego oraz sukcesywne prowadzenie badań, w tym również m.in. testów konserwacji [1].

Z uwagi na częstą obecność w kosmetykach substancji organicznych pochodzenia roślinnego, zwierzęcego i mineralnego, kosmetyki stanowią dobrą pożywkę do namnażania drobnoustrojów. W celu zapobiegania

¹ pnowaczyk@hamilton.com.pl, Laboratorium Badania Kosmetyków i Chemii Gospodarczej, J.S. Hamilton Poland S.A., www.hamilton.com.pl

² kamila.korzekwa@uwr.edu.pl, Zakład Mikrobiologii, Instytut Mikrobiologii i Genetyki, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski, www.uni.wroc.pl

namnażania się patogenów, konieczne jest stosowanie w recepturze kosmetyku m.in. substancji konserwujących, działających bakteriobójczo lub bakteriostatycznie i uniemożliwiających zakażenie kosmetyków drobnoustrojami [2]. Oprócz typowych środków konserwujących, coraz częściej stosuje się w kosmetyce np. olejki eteryczne, ekstrakty czy substancje zapachowe, które oprócz swej podstawowej funkcji, jaką jest nadawanie zapachu kosmetykom, wykazują aktywność przeciwdrobnoustrojową [3]. Należy pamiętać, że niektóre konserwanty chemiczne, jak również np. olejki eteryczne, dodawane do kosmetyków w dużych ilościach mogą powodować podrażnienia lub alergie [4], dlatego też należy je stosować w możliwie niskich stężeniach. Dodatkowo, na zanieczyszczenia kosmetyków drobnoustrojami mają wpływ takie elementy jak czystość hali produkcyjnej, warunki magazynowania i transportu.

W przewodniku Dobrych Praktyk Produkcji zawarte są wytyczne dotyczące m.in. produkcji kosmetyków, ich kontroli, magazynowania i wysyłki produktów kosmetycznych, które należy spełnić, aby zapobiec zakażeniom kosmetyków drobnoustrojami [5].

Bezpieczeństwo kosmetyku stawiane jest zawsze na pierwszym miejscu, nawet wyżej niż jego skuteczność. Dlatego też, aby potwierdzić nieszkodliwość danego produktu, wykonuje się wiele badań uzasadniających deklarację stosowania danego kosmetyku. W zależności od rodzaju produktu wykonuje się testy mikrobiologiczne, ale także sensoryczne, dermatologiczne, trychologiczne, okulistyczne, ginekologiczne, jak również wiele badań aplikacyjnych [6].

Kosmetyk stosowany w niewłaściwy sposób może wywoływać niepożądane reakcje ze strony organizmu konsumenta. Niewłaściwe składniki wchodzące w skład kosmetyku mogą podrażniać komórki naskórka lub być przyczyną alergii [7]. Ich porównanie przedstawiono w tabeli 1.

Niekorzystnym skutkiem stosowania kosmetyków jest coraz częściej pojawiająca się alergia kontaktowa u ludzi, reprezentująca tzw. IV typ alergii. Zachodzi ona bardzo często poza miejscem kontaktu z substancją alergizującą [7].

Do patogenów najczęściej izolowanych z kosmetyków należą: *Pseudomonasaeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Candida albicans*. Z tego powodu normy metodyczne (ISO) zalecają badanie czystości mikrobiologicznej kosmetyków pod kątem obecności tych drobnoustrojów. Ponadto, z kosmetyków izolowanych jest wiele innych bakterii, jak np. *Burkholderiacepacia*, *Bacillus sp.*, *Klebsiella sp.* czy *Serratia sp.* oraz grzybów pleśniowych, w tym *Aspergillus brasiliensis*.

Tabela 1. Charakterystyka porównawcza podrażnienia i alergii

| Podrażnienie | Alergia |
|---|---|
| Częstość występowania | |
| 70-80% reakcji nietolerancji | 20-30% reakcji nietolerancji |
| Charakterystyka | |
| Zjawisko grupowe Pojawienie się szybkie Kontaktowe Proporcjonalne do stężenia Uczucie pieczenia, poparzenie Powierzchnia lśniąca | Zjawisko indywidualne Opóźnione Na odległość Nieproporcjonalne do stężenia Świąd Wyprysk |
| Histologia | |
| Naciek z leukocytów wielojądrzastych | Naciek z limfocytów |
| Mechanizm | |
| Toksyczny Umiejscowienie: naskórek Zniszczenie płaszczą hydrolipidowego i komórek warstwy rogowej | Immunologiczny Skóra właściwa Nie ma zniszczenia komórek |

Źródło: [7]

2. *Pseudomonas aeruginosa*

Są to Gram – ujemne, oksydazo – dodatnie, urzęsione pałeczki niefermentujące laktozy, o prostym lub nieznacznie zakrzywionym kształcie. *P.aeruginosa* to bakterie bezotoczkowe, nie tworzące form przetrwalnych i wykazujące metabolizm tlenowy. W naturze występują głównie w wodzie, glebie i żywności [8, 9]. Mają małe wymagania odżywcze, dużą tolerancję na zasolenie [8] i rosną w temperaturze 4°C - 45°C [9]. Cechami odróżniającymi *P.aeruginosa* od innych pałeczek *Pseudomonas sp.* jest m.in. wytwarzanie barwnika piocyjaniny oraz zdolność do wzrostu w temperaturze 42°C [10]. Szczepy tej bakterii są odporne na wiele antybiotyków oraz środki dezynfekcyjne [8, 11]. Oporność tych bakterii przejawia się m.in. syntezą enzymów rozkładających dany związek w komórce, stanowiąc tym samym element oporności naturalnej (wrodzonej) typowej dla *P.aeruginosa* np. w stosunku do czwartorzędowych soli alkiloamoniowych, będących składnikiem środków dezynfekcyjnych. U pałeczek *P.aeruginosa* występuje ponadto oporność nabyta (fenotypowa), która jest wynikiem selekcji lub adaptacji drobnoustrojów do trudnych warunków środowiskowych. Pod wpływem środków dezynfekcyjnych zostają zniszczone tylko wrażliwe komórki, zaś

oporne rozwijają się nadal, stanowiąc populację niewrażliwą na dany dezynfektant. Skutkiem tego jest tworzenie biofilmu – drobnoustroje wytwarzają dodatkowe warstwy lipidów na powierzchni komórki, co uszczelnia je i tym samym ogranicza kontakt preparatu z komórką [8, 11]. Ważną cechą *P.aeruginosa* jest tzw. oporność krzyżowa na czwartorzędowe sole amoniowe i chloroheksydynę, gdzie komórki bakterii odporne na jeden preparat są jednocześnie bardziej odporne na drugi preparat. Bakterie te powodują m.in. choroby oczu, uszu, serca, zakażenia przyranne, zakażenia układu oddechowego i OUN oraz wiele innych. Do infekcji tymi bakteriami dochodzi zwykle w stanach zmniejszonej odporności organizmu.

P.aeruginosa dobrze namnażają się w kosmetykach, w których występuje faza wodna [8, 11], dlatego też konieczne jest badanie wody, w zakładach produkujących kosmetyki, na obecność tych patogenów [12]. Istotne jest również to, że kosmetyki są narażone na skażenie tym drobnoustrojem w miejscach, gdzie ich przechowywanie jest związane z większą wilgotnością, np. łazienka. Ponadto typ opakowania ma istotny wpływ na utrzymanie kosmetyku przez zakażeniem wtórnym podczas jego stosowania. W piśmiennictwie znany jest przypadek infekcji szpitalnej niemowląt, spowodowanej przez *P.aeruginosa* wskutek skażenia kremu do rąk stosowanego przez personel szpitala [2]. Inne doniesienia naukowe pokazują, że drobnoustroje te izolowano z kosmetyków kolorowych, takich jak np. tusze do rzęs czy cienie do powiek [2]. Badania naukowe z 2000 r. [2] wskazują, że wraz z upływem czasu stosowania produktów kosmetycznych drastycznie wzrastał odsetek ich zakażenia m.in. przez *P.aeruginosa*. Dane pochodzące z systemu RAPEX (Wspólnotowego Systemu Szybkiej Informacji) z lat 2008 – 2014 wykazały obecność *P.aeruginosa* m.in. w takich produktach, jak: masło Shea, balsam do ciała, puder, krem do rąk, pasta do mycia rąk, szampon, emulsja do opalania i balsam do ciała dla dzieci [13].

3. *Staphylococcus aureus*

Są tonieruchliwe inieprzetrwalnikujące Gram – dodatnie, koagulazo – dodatnie i katalazo – dodatnie ziarniaki. Występują w skupiskach przypominających grona, tworząc gładkie kolonie o żółtej barwie. Są względnie beztlenowcami, ale dobrze rosną również w warunkach tlenowych [10, 11, 14]. Czynnikiem ich selektywnego wzrostu jest dodatek mannitolu i NaCl do pożywki [10]. Wykazują zdolność do β – hemolizy [10]. Dobrze rosną w pH obojętnym, ale także lekko zasadowym lub nawet kwaśnym. Wiele gatunków z rodzaju *Staphylococcus* sp. (w tym *S.aureus*) kolonizuje głównie skórę i błonę śluzową przedśionka nosa [10, 11, 14], gardło, drogi moczowo - płciowe i przewód pokarmowy [14]. *S.aureus* jest drobnou-

ustrojem oportunistycznym [14], ajego nosicielstwoprzejawia się u 20 – 40% osób czynawet 90% (personel medyczny). *S.aureus* powoduje zakażenia ropne skóry, tkanek podskórnych i tkanek miękkich, zakażeń układowych oraz zakażeń lub zatruc związanych z produkcją toksyn (m.in. gronkowcowy zespół wstrząsu toksycznego (TSS) [10, 14]. Z uwagi na łatwość nabywania oporności na antybiotyki (gronkowce metycylinooporne – MRSA), patogen ten powoduje częste zakażenia szpitalne [10]. Chorobotwórczość gronkowców wynika m.in. z ich zdolności do wytwarzania specyficznych enzymów i toksyn [10, 14]. Do czynników zjadliwości należą: otoczka bakteryjna (umożliwiająca wiązanie komórki bakteryjnej z komórkami śródbłónka i monocytami), białko A (blokuje działanie immunoglobulin klasy IgG), białka adhezyjne (mają zdolność łączenia się z białkami makroorganizmu, m.in. clumpingfactor) i cytotoksyny (TSST-1, toksyna alfa, delta i gamma), enterotoksyny gronkowcowe i toksyny epidermolityczne [10, 11, 14].

W literaturze notowane są przypadki stwierdzenia *S.aureus* m.in. w balsamach i kremach do ciała [2] oraz kremach do masażu [13].

4. *Escherichia coli*

E.coli, to Gram - ujemne, nieprzetrwalnikujące pałeczki wykazujące ruch, o małych wymaganiach odżywczych. Są względnie beztlenowcami, fermentującymi laktozę, rozkładającymi tryptofan do indolu, a także wytwarzającymi katalazę i niewytwarzającymi oksydazy cytochromowej [10, 11]. Zdolność do fermentacji laktozy pozwala różnicować *E.coli* na pożywce MacConkey'a od pałeczek laktozo – ujemnych. Bakterie te są eurytermiczne – rosną w szerokim zakresie temperatur (6 - 46°C), a optimum dla ich wzrostu wynosi 37°C. Podobnie, zakres pH przy którym rosną jest szeroki, bo waha się w przedziale 4,4 – 9,0 (optimum 6,0 – 7,0). Minimalna aktywność wody, przy której obserwowany jest wzrost *E.coli* wynosi 0,95 [11]. Niektóre szczepy zawierają geny kodujące czynniki wirulencji, np. hemolizyny wydzielane przez te bakterie do środowiska zewnętrznego oraz hemolizyny związane z komórką bakteryjną. Substancje te powodują m.in. hemolizę krwinek czerwonych niektórych leukocytów oraz komórek śródbłónka. Ponadto stymulują apoptozę limfocytów [15], tym samym osłabiając zdolności obronne organizmu. Ze względu na różne czynniki wirulencji, mechanizm ich działania oraz objawy kliniczne, bakterie należące do tego gatunku podzielono na [10, 11]:

Enteropatogenne *E.coli* (EPEC) – objawami zatrucia są: gorączka, bóle brzucha, nudności, wymioty i śluzowe biegunki.

Enterotoksyczne *E.coli* (ETEC) – objawy – to silne biegunki.

Enteroinwazyjne *E.coli* (EIEC) – objawy dotyczą gorączki, bólu brzucha, głowy i mięśni oraz śluzowej biegunki z domieszką krwi.

Enterokrwtoczne *E.coli* (EHEC) – objawy -to silne krwawe biegunki.

Enteroagregujące (EAEC) lub adherencyjne (DAEC) *E.coli* – wywołują silne biegunki u dzieci i przewlekłe wodne biegunki u dorosłych.

Pałeczki *E.coli* stanowią naturalną florę fizjologiczną układu pokarmowego człowieka oraz występują przejściowo na skórze i błonach śluzowych. Mogą powodować zakażenia oportunistyczne, których następstwem są zatrucia pokarmowe, zapalenia płuc i ucha środkowego, zakażenia układu moczowo-płciowego, zapalenia szpiku, kości i stawów, a także ostre ropne zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych. Ponadto mogą powodować bakteriemie i posocznice dając uogólnione infekcje [10, 11, 15].

E.coli jest wskaźnikiem kałowego zanieczyszczenia wody, stąd zakażeniu może ulec już sam surowiec na etapie produkcji kosmetyków. Dodatkowo, niedostateczna higiena pracowników może być przyczyną skażenia mikrobiologicznego produktu na etapie jego wytwarzania. Z uwagi na to, że *E.coli* jest bakterią powszechnie występującą, zachodzi duże prawdopodobieństwo skażenia produktów kosmetycznych tym patogenem podczas ich stosowania. Zespół naukowy Behravan i wsp. [16] donosi, że znaczna część nowych, nie otwieranych produktów kosmetycznych zawiera już *E.coli*, a wraz z używaniem kosmetyków ich liczba w produkcji gwałtownie wzrasta.

5. *Candida albicans*

C.albicans jest grzybem, który rośnie w formie komórek drożdżopodobnych, rozmnażających się poprzez pączkowanie, choć może także tworzyć m.in. pseudostrzępki lub strzępki właściwe [17-19]. Ponadto *C.albicans* tworzy tzw. chlamydospory, będące formami przetrwalnikowymi [19], które mogą być przyczyną skażeń mikrobiologicznych kosmetyków. Podczas codziennego stosowania kosmetyku, temperatura ciała bliska 37°C, a także zawartość CO₂ w otoczeniu oraz obecność glukozy i niektórych aminokwasów w środowisku, powodują przekształcenie form przetrwalnych tego grzyba w formy wegetatywne z wytworzeniem strzępek. Zdolność tego patogenu do wytwarzania form przetrwalnikowych w niekorzystnych dla siebie warunkach środowiskowych dodatkowo zwiększa prawdopodobieństwo jego występowania w produktach kosmetycznych.

C.albicans wchodzi w skład naturalnej flory fizjologicznej przewodu pokarmowego, oddechowego, moczowo – płciowego i skóry [17-19], aczęstość jego występowania zależy od wieku (częściej u dzieci i osób starszych). *C.albicans* może powodować zakażenia powierzchniowe

i układowe u ludzi [18-20], przy czym te pierwsze dotyczą najczęściej skóry, paznokci i błon śluzowych jamy ustnej i gardła, przełyku, jelit i pochwy. Zakażenia układowe natomiast są skutkiem przedostania się tego grzyba do krwi, narządów i tkanek. Rozwój zakażeń powodowanych przez *C.albicans* zależy od stanu układu odpornościowego i wielu czynników wirulencji (pleomorfizm, adhezja, produkcja enzymów hydrolitycznych) [18, 20].

Z uwagi na to, że *C.albicans* jest grzybem kolonizującym człowieka, istnieje duże prawdopodobieństwo skażenia kosmetyków tym patogenem. Udowodniono obecność *C.albicans* w kremie do rąk i cieniach do powiek [2], a najnowsze badania z 2015 roku wykazały również obecność *C.albicans* w kremie na bazie żelu [21]. Zgodnie z zapisami raportu RAPEX, w latach 2008 – 2014 zgłoszono w Niemczech działanie niepożądane kosmetyku (masło Shea) w postaci stwierdzenia w nim obecności *C.albicans* [13].

Ze względu na to, że kosmetyki nie są jałowe oraz że istnieje duże prawdopodobieństwo ich zakażenia, wprowadzono normę ISO 17516 [22], w której ustalono limity mikrobiologiczne dla produktów kosmetycznych. Według tych wytycznych nie dopuszcza się obecności *P.aeruginosa*, *S.aureus*, *E.coli* i *C.albicans* w 1 g / ml produktu.

6. *Burkholderia cepacia*

B.cepacia, to Gram – ujemna pałeczka, wykazująca zdolność ruchu i tworząca gładkie, małe kolonie na pożywkach nieselektywnej. Optymalną temperaturą ich wzrostu jest 30°C, ale rośnie nawet w 40°C. Na pożywkach selektywno – różnicującej bakteria ta rośnie w postaci okrągłych kolonii z regularnym i gładkim brzegiem, wybarwiających się na szafiowo – zielony kolor i powodujących różowienie pożywki. *B.cepacia* na agarze z krwią daje β - hemolizę. Minimalna aktywność wody (A_w) niezbędna do ich wzrostu wynosi 0,95. *B.cepacia* prowadzi metabolizm tlenowy [3, 9] i należy do bakterii brodawkowych, ponieważ wykazuje zdolność wiązania wolnego azotu z powietrza. Środowiskiem jej występowania jest gleba, choć naturalnie zasiedla także zdrowe rośliny, będąc przyczyną coraz częstszych zanieczyszczeń mikrobiologicznych surowców roślinnych stosowanych w produkcji kosmetyków.

B.cepacia jest bakterią oportunistyczną, powodującą m.in. zapalenie płuc, choroby układu moczowego, bakterie mię u osób z obniżoną odpornością i zapalenie wsierdza.

W ostatnich latach coraz częściej obserwuje się zakażenia mikrobiologiczne surowców kosmetycznych i kosmetyków gotowych, powodowane przez *B.cepacia*. W krajach Unii Europejskiej, w latach 2005 – 2008

odnotowano aż 24 przypadki zakażeń mikrobiologicznych kosmetyków powodowanych przez *B.cepacia* [23]. W 2008 r. w Hiszpanii, u pięciu pacjentów szpitala wykazano obecność *B.cepacia*. Przyczyną zakażenia było mleczko do ciała, stosowane przez personel szpitalny do pielęgnacji chorych [23]. W 2012 roku u kilkunastu pacjentów szpitala w Niemczech, stwierdzono obecność tego drobnoustroju w wymazach z dróg oddechowych i jamy ustnej, a źródłem zakażenia było stosowanie bezalkoholowego płynu do płukania jamy ustnej, zanieczyszczonego *B.cepacia* [22]. Przeprowadzone w 2013 r. badania kosmetyków w Turcji [22], potwierdziły obecność *B.cepacia* w kremie nawilżającym, kremie do pielęgnacji twarzy oraz paście do zębów, przy czym najmniejszy poziom kontaminacji tym drobnoustrojem stwierdzono w paście do zębów, a największy w kremie nawilżającym.

Dane pochodzące z systemu RAPEX wykazały w latach 2008 – 2014 aż 62 zgłoszenia zagrożeń mikrobiologicznych produktów kosmetycznych. Okazało się, że *B.cepacia* jest jednym z głównych drobnoustrojów zanieczyszczających kosmetyki. Była obecna w płynie do płukania jamy ustnej, żelu do kąpieli, odświeżaczu do ust, peelingu do ciała, płynie do demakijażu oraz żelu do ćwiczeń.

7. *Bacillus sp.*

Bakterie należące do tego rodzaju, to tlenowe lub względnie beztlenowe laseczki Gram – dodatnie, tworzące endospory (przetrwalniki umożliwiające im zasiedlanie wielu różnych środowisk). Tolerują duże stężenie soli (nawet do 10%), szeroki zakres pH (1-10) i temperatury (5-75°C). Na pożywce agarowej, tworzą dość duże kolonie (3-10 mm), matowe lub błyszczące z nieregularnym brzegiem. Spośród wielu gatunków tego rodzaju można wyróżnić zarówno komensale ludzi i zwierząt, saprofity wolno żyjące w przyrodzie, jak i bezwzględnie chorobotwórcze gatunki ludzi, zwierząt i roślin [10]. Niektóre gatunki są endofitami roślin cytrusowych [24] i mogą stanowić zagrożenie mikrobiologiczne kosmetyków, które w swoim składzie zawierają te rośliny. Dodatkowo, zdolność tych drobnoustrojów do wytwarzania form przetrwalnych, może być przyczyną częstego zakażenia kosmetyków tym patogenem, chociażby z uwagi na oporność ich przetrwalników na wysoką temperaturę. *Bacillus sp.* uczestniczą w tworzeniu biofilmu [2], stąd mogą powodować zanieczyszczenia linii produkcyjnej. Zdolność wytwarzania licznych enzymów przez te bakterie może powodować rozkład składników kosmetyków [2]. Liczne badania naukowe, w tym Behravana i wsp. [16] wykazały obecność *Bacillus sp.* w kosmetykach.

8. *Klebsiella sp.*

Gatunki z rodzaju *Klebsiella sp.*, to Gram – ujemne, nieruchliwe pałeczki tworzące grube otoczki. Ich cechą charakterystyczną jest „puchaty” lub śluzowany wygląd kolonii na pożywce agarowej. Wśród bakterii należących do tego rodzaju, szczególne znaczenie ma *K.pneumoniae* – gatunek tworzący florę fizjologiczną przewodu pokarmowego i skóry, ale również drobnoustroj opornisty, powodujący choroby układu oddechowego i zakażenia dróg moczowych. Badania Perry i wsp. [2] wykazały obecność *K.pneumoniae* w kremie do rąk, powodując zapalenie skóry u ludzi. Inne badania donoszą o skażeniu mikrobiologicznym kosmetyków kolorowych (tusze do rzęs, cienie do powiek) oraz szamponu do włosów tym patogenem [2]. Dane pozyskane z systemu RAPEX z lat 2008-2014 wskazują na izolację tych drobnoustrojów z pasty do zębów, szamponu i mydła [13].

9. *Serratia sp.*

To małe, ruchliwe pałeczki niefermentujące L-arabinozy i rafinozy. Mają zdolność wytwarzania m.in. lipazy i DNAzy oraz nie rozkładają laktozy (z wyjątkiem *S.rubidea* i *S.odorifera*). Charakterystyczną cechą bakterii należących do rodzaju *Serratia sp.* jest wytwarzanie w temperaturze 25°C czerwonego barwnika – prodigiozyny [10]. Minimalna aktywność wody (a_w) do ich wzrostu wynosi 0,91. Gatunki z tego rodzaju należą do endofitów – część ich cyklu rozwojowego jest związana z naturalną kolonizacją tkanek roślinnych. Naturalnie występują w ryżu [24], co może sugerować ich obecność w tych produktach kosmetycznych, których surowcem jest ekstrakt tej rośliny. Bakterie te występują powszechnie w przyrodzie i preferują miejsca wilgotne, stanowiąc florę autochtoniczną [24]. Można je izolować np. w łazienkach (prysznic, umywalki), gdzie wilgotność jest na ogół wyższa. Badania naukowców z USA wykazały obecność *Serratia sp.* w balsamach do ciała i szamponach do włosów [2].

10. *Aspergillus sp.*

Grzyby należące do rodzaju *Aspergillus sp.* są drobnoustrojami oportunistycznymi, powodującymi schorzenia głównie u osób z obniżoną odpornością. Najliczniej występują w glebie, w rozkładających się szczątkach organicznych i powietrzu. Charakterystyczną cechą wszystkich gatunków tego rodzaju jest zdolność wytwarzania zarodników, co znacznie ułatwia rozprzestrzenianie się grzybów pleśniowych w środowisku. Im wyższa wilgotność względna powietrza i temperatura, tym rozwój grzybów jest większy [11, 17, 24].

Aspergillus sp. jest przyczyną infekcji powierzchniowych skóry i grzybic narządowych. Wrotami zakażenia są głównie drogi oddechowe. Najczęstszą

postacią inwazyjnej aspergilozy jest zapalenie płuc. Wiadomo, że zarodniki grzybów obecne w powietrzu mogą powodują alergię nadwrażliwości, z których najczęściej obserwowana jest alergia wziewna, obejmująca górne i dolne drogi oddechowe. Objawami alergicznego zapalenia błony śluzowej nosa u osób nadwrażliwych na alergeny grzybów jest najczęściej wodnisty wyciek z nosa, kichanie i świąd nosa [11, 17, 24].

Z uwagi na zdolność tworzenia zarodników, zakażenie kosmetyków tym grzybem, zarówno na etapie produkcji, jak i późniejszego stosowania kosmetyku jest bardzo realne. Z tego powodu obligatoryjnie wykonywane są testy konserwacji kosmetyków z zastosowaniem szczepu *Aspergillus brasiliensis*, wykluczające możliwość namnażania tego grzyba w produktach kosmetycznych [25].

11. Podsumowanie

Każdy kosmetyk, zarówno na etapie produkcji, jak i późniejszego stosowania, narażony jest na skażeniemikrobiologiczne. Aktualne ustawodawstwo nie daje precyzyjnych wytycznych, jakie działania należy podejmować, by zabezpieczyć produkt przed zanieczyszczeniem. Istotne jest przestrzeganie zasad GMP [5], które mogą w znaczący sposób ograniczyć możliwość zakażenia kosmetyków. Stosowane w recepturach konserwanty mają zapobiegać działaniom niepożądanym związanym ze stosowaniem kosmetyków. Należy jednak pamiętać, że konserwanty dodaje się do kosmetyków, żeby chronić je przed wtórnym zakażeniem podczas ich późniejszego stosowania, a nie jako środek bakteriobójczy/grzybobójczy niwelujący błędy produkcji. Należy mieć na uwadze, że w ostatnich latach częstą przyczyną zakażeń mikrobiologicznych kosmetyków są drobnoustroje niespecyficzne, pochodzące najczęściej z zanieczyszczonych surowców stosowanych do produkcji kosmetyków, pochodzących z krajów dalekiego wschodu.

Literatura

1. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009 z dnia 30 listopada 2009 r. dotyczące produktów kosmetycznych
2. Obrębska K.B., Szczygła A., Matejczyk M. *Skażenia mikrobiologiczne surowców i produktów kosmetycznych*, Postępy Mikrobiologii, 47 (2008), s. 65-71
3. Nachajski M.J., Młynarska N., Kołodziejczyk M.K. *Środki konserwujące stosowane w kosmetykach*. Cz. I. Polish Journal of Cosmetology, 14 (2011), s. 212-216
4. Wojciechowska M., Kołodziejczyk J., Bartuzi Z. *Alergia na kosmetyki*. Cz. II. – *Konserwanty*, Polish Journal of Cosmetology, 12 (2009), s. 224 – 227.

5. PN-EN ISO 22716:2009 Kosmetyki – Dobre Praktyki Produkcji (GMP). Przewodnik Dobrych Praktyk Produkcji
6. Liwińska A., Flis A., Cięszczyk K. *Evidential suport w świetle deklaracji marketingowych produktów kosmetycznych*. Świat Przemysłu Kosmetycznego, 1 (2016), s. 100-105
7. Martini M.C. *Kosmetologia i farmakologia skóry*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2006
8. Wolska K. i wsp. *Oporność Pseudomonasaeruginosa na antybiotyki*. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 67 (2013), s. 1300-1311
9. Korzekwa K., Kuś M., Doroszkiewicz W.: *Mikrobiologiczne zanieczyszczenia kosmetyków – część II*. Postępy Kosmetologii, 1 (2011), s. 13-20
10. Szewczyk E.M.: *Diagnostyka bakteriologiczna*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005
11. Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z. i wsp. *Mikrobiologia techniczna. Mikroorganizmy w biotechnologii, ochronie środowiska i produkcji żywności*. Tom 2. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2008
12. PN-EN 12780:2005 Jakość wody. Wykrywanie i oznaczanie ilościowe *Pseudomonasaeruginosa* metodą filtracji membranowej
13. Neza E., Centini M. *Microbiologically contaminated and over – preserved cosmetic products according Rapex 2008-2014*. Cosmetics, 3 (2016), doi: 10.3390/cosmetics3010003
14. Młynarczyk G., Młynarczyk A. *Gronkowce (w) Wybrane zagadnienia z mikrobiologii jamy ustnej*. Red. Łuczak M., Kopec – Swoboda E. Wydawnictwo Czelej, Lublin 2004
15. Sobieszkańska B.M. *Hemolizyny Escherichia coli*. Postępy Mikrobiologii, 46 (2007), s. 343-353
16. Behravan J., Bazzaz F., Malaek P. *Survey of bacteriological contamination of cosmetic creams in Iran*. International Journal of Dermatology, 44 (2005), s. 482-485
17. Heczko P.B., Wróblewska M., Pietrzyk A. *Mikrobiologia lekarska*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL. Warszawa 2014
18. Staniszevska M., Bondaryk M., Kowalska M., Magda U., Łuka M., Ochal Z., Kurzątkowski W. *Patogeneza i leczenie zakażeń Candida spp*. Postępy Mikrobiologii, 53 (2014), s. 229-240
19. Trzaska D., Kocot-Warat M., Czuba Z. *Fenotypowa plastyczność dimorficznych form Candida albicans*. AnnalesAcademiaeMedicaeSilesiensis 65 (2011), s. 83-89
20. Staniszevska M., Bondaryk M., Piłat J., Siennicka K., Magda U., Kurzątkowski W. *Czynniki zjadliwości. Candida albicans*. Przegląd Epidemiologiczny, 66 (2012), s. 629-633
21. Chauhan S., Gupta K.C., Singh J. *Examination of microbial flora present in gel based cosmetic creams*. International Journal of Science & Technology, 3 (2015), s. 71-73
22. PN-EN ISO 17516:2014 Kosmetyki. Mikrobiologia. Limity mikrobiologiczne.

23. Nowaczyk P. *Burkholderiacepacia* – bakteria powodująca skażenie mikrobiologiczne kosmetyków. Świat Przemysłu Kosmetycznego, 1 (2016), s. 96-99
24. Błaszczuk M.K. *Mikrobiologia środowisk*. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa 2010
25. PN – EN ISO 11930:2012 Kosmetyki – Mikrobiologia – Test skuteczności i ocena zakonserwowania produktów kosmetycznych

Zakażenia mikrobiologiczne produktów kosmetycznych

Streszczenie

Produkty kosmetyczne to substancje, których zadaniem jest m.in. utrzymanie czystości ciała, perfumowanie, zmiana jego wyglądu i ochrona przed czynnikami zewnętrznymi. Kosmetyk powinien być przede wszystkim bezpieczny, co oznacza między innymi, że nie powinien zawierać drobnoustrojów chorobotwórczych. W niniejszej publikacji przedstawiono charakterystykę najczęściej izolowanych patogenów z kosmetyków: *Pseudomonasaeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Candida albicans*, jak również drobnoustrojów niespecyficznych, jak np. *Burkholderiacepacia*, *Bacillus sp.*, *Klebsiella sp.*, *Serratia sp.* i *Aspergillus brasiliensis*.

Słowa kluczowe: kosmetyk, zakażenie mikrobiologiczne kosmetyków, bakterie w kosmetykach, grzyby w kosmetykach, czystość mikrobiologiczna kosmetyków

Microbiological contamination of cosmetic products

Abstract

Cosmetic products are substances whose tasks include maintaining the purity of the body, perfuming them, changing their appearance and protection against external factors. Cosmetic should be primarily safe, which means it should not contain pathogens. This publication presents the characteristics of the most frequent pathogens isolated from cosmetics: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*, as well as non-specific microorganisms, such as: *Burkholderiacepacia*, *Bacillus sp.*, *Klebsiella sp.*, *Serratia sp.*, and *Aspergillus brasiliensis*.

Keywords: cosmetics, microbial contamination of cosmetics, bacteria in cosmetics, fungi in cosmetics, microbiological purity of cosmetics

Zastosowanie filtracji żelowej do określania mechanizmu działania inhibitora na kinazę, na przykładzie pochodnej benzimidazolu i nietypowej kinazy Rio1

1. Wprowadzenie

Filtracja żelowa (ang. *gel filtration chromatography*, GFC) jest techniką klasycznej chromatografii niskociśnieniowej, której podstawą jest separacja makrocząsteczek z wykorzystaniem porowatej struktury fazy stacjonarnej. Chromatografia wykorzystuje zjawisko dyfuzji solwentu i separowanych cząstek pomiędzy cząsteczkami złoża. Jako złożo chromatograficzne stosuje się żel zawierający kuliste ziarna, charakteryzujące się wysoką porowatością. Jednym z najczęściej stosowanych w tej technice wypełnień kolumny chromatograficznej jest grupa komercyjnych złożów o handlowej nazwie Sephadex. Są to złoża zawierające usieciowany dekstran. Materiał przeznaczony do separacji jest przepuszczany przez złożo. Cząsteczki, o rozmiarach mniejszych od porów dyfundują w fazie stacjonarnej, natomiast większe poruszają się razem z fazą ruchomą, pomijając porowate ziarna żelu. Im mniejsza jest molekula, tym ma większą zdolność penetracji złoża, a co za tym idzie – mniejszą prędkość przepływu. W związku z tym, kolumnę opuszczają najpierw molekuly większe, a później, stopniowo wmywane ze złoża są molekuly mniejsze [23].

Kinazy białkowe to bardzo ważny składnik ludzkiego proteomu. Rodzina kinaz składa się z 518 enzymów, dzięki czemu zalicza się do najliczniejszych grup białek w organizmie człowieka [13]. Ich rolą jest przeprowadzanie procesu fosforylacji. Odwracalna fosforylacja białka jest kluczowym mechanizmem regulacyjnym w żywych organizmach, który moduluje strukturę, funkcje i aktywność biologiczną różnych białek. Kinazy białkowe odgrywają ważną rolę w wielu kluczowych procesach

¹ pawel.tyczk@gmail.com, Koło Naukowe Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Nauk o Środowisku, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, www.kul.pl

² maciekm@kul.pl, Katedra Biologii Molekularnej, Wydział Biotechnologii i Nauk o Środowisku, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, www.kul.pl

³ kubin@kul.pl, Katedra Biologii Molekularnej, Wydział Biotechnologii i Nauk o Środowisku, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, www.kul.pl

komórkowych. Regulują one między innymi cykl komórkowy i współdecydują o życiu i śmierci komórek [1, 4, 7].

Do nadrodziny kinaz białkowych należy 40 enzymów sklasyfikowanych jako nietypowe kinazy białkowe, dzięki posiadaniu niewystępujących u innych kinaz struktur. Do tej grupy zaliczana jest m.in. kinaza Rio1, członek mniejszej rodziny RIO, w skład której wchodzi również białka Rio2, Rio3 i RioB [2]. Enzymy te charakteryzują się wysoką konserwatywnością. Występują u szerokiej gamy organizmów – począwszy od archeocetów, a skończywszy na organizmach wyższych, w tym także u ludzi [10]. Rio1 bierze udział w biogenezie rybosomów i progresji cyklu komórkowego [5, 21, 22]. Badania wykazały, że Rio1 w drożdżach jest czynnikiem nierybosomalnym, który jest niezbędny do przekształcenia 20pre-S rRNA w 18S rRNA – składnika podjednostki 40S [2, 20]. Niewiele wiadomo na temat fizjologicznej roli fosforylacji substratów komórkowych przez Rio1, a także o autofosforylacji tej kinazy. Stwierdzono, że enzym ulega podwyższonej ekspresji w przypadku raka jelita grubego i istnieje bezpośredni związek między deregulacją biogenezy rybosomu a rozwojem nowotworu [18].

Istnieje wiele cząsteczek i czynników działających hamująco na aktywność kinaz. Jednakże nie dysponujemy jeszcze szeroką wiedzą na temat inhibitorów kinazy Rio1. Pierwszym opisanym niskocząsteczkowym inhibitorem kinazy Rio1 jest Tojokamycyna. Związek ten wykazuje w stosunku do Rio1 inhibicję mieszaną. Spowodowane jest to podwójnym oddziaływaniem na kinazę. Po pierwsze, jest on ATP-kompetycyjnym inhibitorem, po drugie zaś promuje utrzymanie enzymu w oligomerycznej izoformie, która cechuje się niższą aktywnością katalityczną [9].

Pochodne benzimidazolu stanowią największą rodzinę ATP –kompetycyjnych inhibitorów innej – kinazy białkowej – CK2. Pochodne benzimidazolu skutecznie hamują aktywność zarówno formy natywnej i rekombinowanej CK2, zarówno *in vitro*, jak też w hodowli komórkowej, wykazując przy tym własności proapoptotyczne [8, 16, 24]. Opierając się na związku prekursorze – 5,6-dichloro-1-(β -D-rybofuranozylo) benzimidazolu (DRB) [24], struktura inhibitorów została zoptymalizowana w celu lepszego dopasowania w kieszeni wiążącej ATP [15]. W związku z tym, do najbardziej skutecznych, jak również komercyjnie dostępnych benzimidazolowych inhibitorów CK2 zalicza się związki: TBB TBI i DMAT [17]. Jednym z związków zaliczanych do tej grupy jest także 4,6-dibromo-5,7-dijodobenzimidazol (DBDI), znany jako K95 [6].

W niniejszej pracy opisano wpływ związku K95 – znanego inhibitora kinazy białkowej CK2 – na kinazę białkową Rio1 jako potencjalnie nowego inhibitora dla tego enzymu. Jako jedną z technik potwierdzających działania K95 na Rio1, zastosowano filtrację żelową, umożliwiającą rozdzielanie cząsteczek białek o różnej strukturze czwartorzędowej, a tym samym o różnej masie.

2. Materiały i metody

2.1. Inhibitor K95

Syntezę związku K95 (4,6-dibromo-5,7-dijodobenzimidazol; DBDI) i jego aktywność biologiczną opisano w innej pracy [6].

2.2. Testy aktywności kinazy Rio1

W pracy zastosowano kinazę Rio1 w postaci rekombinacyjnego białka wyprodukowanego w systemie heterologicznym *E.coli*.

Plazmid ekspresyjny niosący gen kodujący ludzką kinazę Rio1 został udostępniony przez profesor Nicole LaRonde-LeBlanc (Uniwersytet Maryland, USA). Kinaza Rio1, została wyprodukowana w bakteriach, a następnie oczyszczona tak jak opisano to w innej pracy [10].

Aktywność kinazy Rio1 określono na podstawie testu ilości przyłączonego fosforu z [γ - 32 P]ATP w wyniku autofosforylacji. W tym celu, kinazę inkubowano w 37°C przez 15 minut, w 50 μ l próbkach. Mieszanina reakcyjna zawierała 100 pmoli oczyszczonej kinazy Rio1, odpowiednie stężenie inhibitora K95 w zależności od eksperymentu (0,01 μ M do 100 μ M), a także bufor reakcyjny składający się z 0,5 μ M [γ - 32 P]ATP, 50 mM NaCl, 10 mM Mg $^{2+}$, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) oraz 6 mM 2-merkaptoetanol.

Reakcje fosforylacji przerywano po 15 minutach poprzez dodanie buforu próbkowego SDS/PAGE (125 mM Tris-HCl, 20% glicerol, 3% DTT, 4% SDS, 0,001% błękit bromofenolowy). Próbki poddawano rozdzielaniu elektroforezycznemu. Żele zostały następnie wybarwione roztworem błękitu kumazyny i poddane wysuszeniu. Widoczne prążki białkowe kinazy Rio1 znakowane γ - 32 P zostały wycięte z żelu i przeznaczone do analizy promieniowania. Intensywność promieniowania prążków oznaczono za pomocą licznika scyntylicyjnego (MicroBeta, Perkin Elmer).

Wartość IC $_{50}$ obliczono za pomocą oprogramowania GraphPad Prism 4.0.

2.3. Badania in silico

Do dokowania molekularnego wybrano strukturę krystaliczną kinazy Rio1 w kompleksie z ADP (PDB ID: 4OTP) zdeponowaną w bazie PDB (Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Jony Mg $^{2+}$ cząsteczki wody, ADP oraz inne ligandy obecne w kompleksie zostały usunięte z użyciem programu Maestro Suite v9.2 (Schrödinger). Następnie strukturę poddano minimalizacji energii wykorzystując serwer YASARA Energy Minimization (<http://www.yasara.org/minimizationserver.htm>).

Program Autodock Tools v1.5.6 (The Scripps Research Institute) został użyty do przydzielenia odpowiednich ładunków do atomów zarówno białka Rio1 jak i liganda K95. Dokowanie molekularne K95 do struktury Rio1 zostało przeprowadzone z użyciem programu Autodock Vina v1.1.2 (The Scripps Research Institute). Podczas dokowania atomy białka pozostawały nieruchome. Strukturę kompleksu analizowano z użyciem programów Maestro Suite i PyMOL v1.2 (Schrödinger).

2.4. Badanie termostabilności

Doświadczenie przeprowadzono zgodnie z protokołem opisanym w pracy Kiburu i LaRonde-LeBlanc [10]. Próbkki o objętości 50 μ l zawierały 50 mM NaCl, 10 mM Mg^{2+} , 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mg/ml Rio1 oraz 0,1 mM K95 lub DMSO (próbka kontrolna). Mieszaniny inkubowano w 4°C przez 30 minut. Następnie do każdej z próbek dodano po 50 μ l barwnika fluorescencyjnego SYPRO Orange. Próbkki podgrzewano od 4°C do 98°C, przy wzroście temperatury 0,2°C/sek. używając termocyklera (CFX-1000, Bio-Rad). Przez całą procedurę prowadzono pomiar intensywności fluorescencji. Wartości temperatury topnienia T_m zostały obliczone przy użyciu programu komputerowego firmy Bio-Rad.

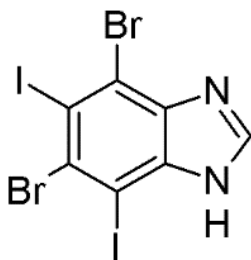
2.5. Filtracja żelowa

Do chromatografii zastosowano kolumnę szklaną wypełnioną złożem Sephadex G-200 (GE Healthcare). Złoże zrównoważono za pomocą buforu o pH 7.5, zawierającego 10 mM Tris, 150 mM NaCl oraz 0,42% β -merkaptotanol. Kolumnę skalibrowano za pomocą preparatu czterech białek o znanych masach: β -amylazy (200 kDa), dehydrogenazy alkoholowej (150 kDa), albuminy surowicy bydlęcej (67 kDa) oraz albuminy jaja kurzego (43 kDa). Białka te nanoszono oddzielnie na kolumnę. Próbkki zawierające kinazę Rio1 (2 mg/ml), bufor oraz kolejno: DMSO (kontrola) lub 10 μ M K95 lub 100 μ M K95. Rozdział chromatograficzny prowadzony był przy przepływie fazy ruchomej wynoszącym 0,2 ml/min przy użyciu systemu FPLC AKTA Purifier 10 (GE Healthcare). Faza ruchoma była monitorowana przez pomiar OD_{280nm} .

3. Wyniki i dyskusja

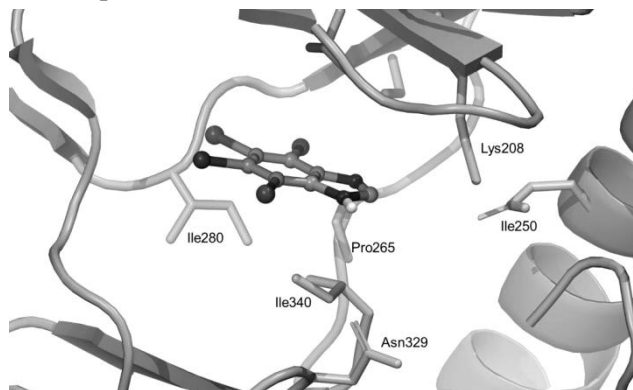
3.1. K95 jako nowy nanomolarny inhibitor kinazy Rio1

Wyniki uzyskane dzięki badaniu wpływu aktywności związku K95 na enzym wskazują, że ludzka kinaza Rio1 wykazuje wrażliwość na benzimidazolowy inhibitor K95 (Rys. 1). Badany związek hamuje autofosforylację kinazy Rio1 w zakresie nanomolarnym ($IC_{50} = 0,013 \mu$ M).



Rysunek 1. Wzór strukturalny K95 [opracowanie własne]

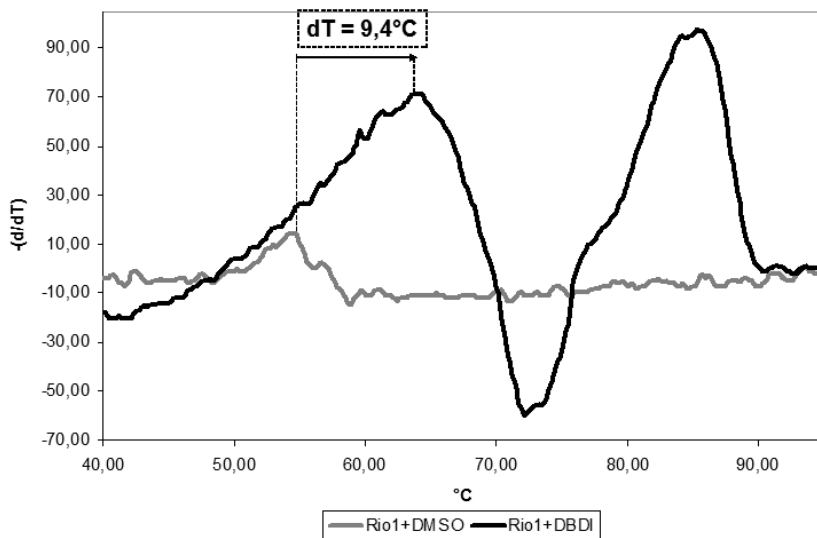
W wyniku dokowania molekularnego z użyciem programu Autodock Vina uzyskano kompleks, w którym inhibitor K95 wypełnia kieszeń wiążącą ATP (Rys. 2). Hydrofobowy pierścień benzenu inhibitora podstawiony atomami jodu i bromu wypełnił przestrzeń w sąsiedztwie aminokwasów hydrofobowych m.in. Ile280, Ile340, Pro265, z którymi uformował wiązania van der Waalsa. Atomy azotu pochodzące z pierścienia imidazolowego skierowane są w kompleksie w stronę hydrofilowych łańcuchów bocznych aminokwasów np. Lys208 formując oddziaływania elektrostyczne. Uzyskany sposób oddziaływania inhibitora K95 z atomami aminokwasów kinazy Rio1 jest podobny do opisanych oddziaływań uzyskanych w strukturach krystalicznych podobnych inhibitorów w kompleksach z kinazą CK2 [19].



Rysunek 2. Obraz z dokowania molekularnego cząsteczki K95 w kieszeni wiążącej ATP ludzkiej kinazy Rio1 [opracowanie własne]. Modelowanie wykonano z wykorzystaniem oprogramowania wymienionego w podrozdziale 2.3

Analiza wpływu inhibitora K95 na kinazę Rio1 wykazały, że znacznie zwiększa on jej termostabilność. Zaobserwowano przesunięcie o 9.4°C

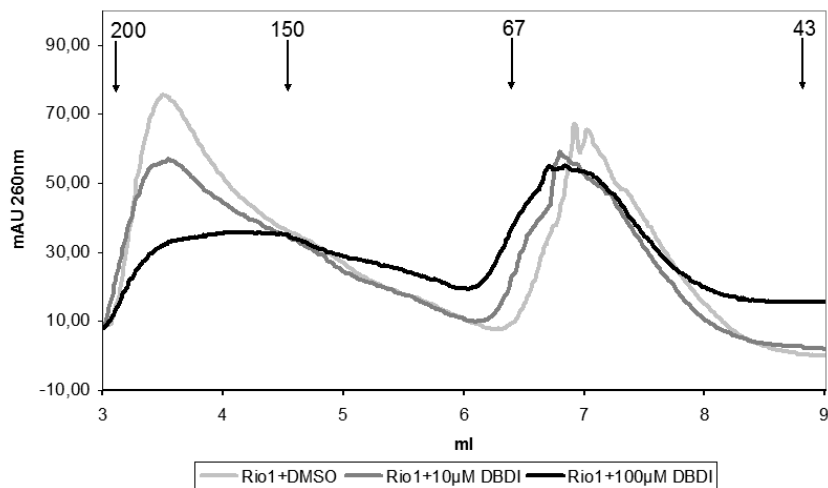
w temperaturze topnienia (T_m) w próbce zawierającej inhibitor (63,8°C), w porównaniu z próbą kontrolną (54,4°C) (Rys. 3). Uzyskane wyniki porównano z danymi przedstawionymi przez Kiburu i LaRonde-LeBlanc, którzy otrzymali przesunięcie temperatury topnienia o 12,1°C w przypadku zastosowania Tojokamycyny [19].



Rysunek 3. Krzywa zmian temperatury topnienia kinazy Rio1 w obecności inhibitora K95 (DBDI). Zmianę T_m jest oznaczono czarną strzałką [opracowanie własne]. Analizy wykonano z wykorzystaniem programu komputerowego firmy Bio-Rad

3.2. Analiza wpływu K95 na strukturę IV-rzędową kinazy Rio1 z zastosowaniem filtracji żelowej

W oparciu o dane uzyskane z analizy chromatograficznej przeprowadzonej w tej pracy (Rys 4.), zaobserwowano, że ludzka kinaza Rio1 może występować w dwóch izoformach: monomer (49 kDa) i tetramer (185 kDa), który stanowi formę nieznacznie przeważającą. Izoformy te widoczne są na Rys. 4 jako wyraźne piki. Podobne obserwacje uzyskali Kiburu i LaRonde [9, 10]. Badacze dowiedli, że nieufosforylowana kinaza Rio1 tworzy oligomery, podczas gdy fosforylacja promuje formę monomeryczną. Jednakże w przeciwieństwie do Tojocamycyny, zwłaszcza w stężeniu 100 μM , badany związek (K95) nie wykazuje inhibicji allosterycznej wobec Rio1, powodując spadek poziomu oligomeryzacji kinazy [14].



Rysunek 4. Chromatograf GFC/SEC z analizy wpływu K95 (DBDI) na zmianę struktury Rio1. Pozycje markerów o odpowiednich masach (w kDa) zaznaczono czarnymi strzałkami [opracowanie własne]. Rozdział prowadzono z wykorzystaniem kolumny szklanej wypełnionej złożem Sephadex G-200 (GE Healthcare) oraz systemu FPLC ÄKTA Purifier 10 (GE Healthcare)

4. Wnioski

W niniejszej pracy badano ludzką nietypową kinazę białkową Rio1 jako nowy cel dla inhibitorów z grupy pochodnych benzimidazolu. Na podstawie licznych danych literaturowych do analiz wyselekcjonowano jeden z tych związków – K95. Nasze wyniki przedstawiają ten związek, jako skuteczny inhibitor kinazy Rio1. Związek hamuje autofosforylację Rio1 w zakresie nanomolarnym, powodując spadek poziomu oligomerizacji kinazy i poprawiając parametr termostabilności tego enzymu.

Poznanie inhibitorów kinazy Rio1 to wciąż młoda gałąź badań. Konieczne są tu dalsze analizy wpływu innych związków i czynników na ten niezbędny dla komórki enzym. Uzyskana w ten sposób wiedza może pomóc zrozumieć rolę kinazy Rio1 w cyklu życiowym komórek.

Literatura

1. Ahn N.G., Resing K.A., *Toward the phosphoproteome*, Nature Biotechnology, 19 (2001), s. 317-318
2. Angermayr M., Bandlow W., RIO1, *An extraordinary novel protein kinase*, FEBS Letters, 524 (2002), s. 31-36
3. Angermayr M., Roidl A., Bandlow W., Yeast Rio1p is the founding member of a novel subfamily of protein serine kinases involved in the control of cell cycle progression, Molecular Microbiology, 44 (2002), s. 309-324
4. Cohen P., *The origins of protein phosphorylation*, Nature Cell Biology, 4 (2002), s. 127-130
5. Ferreira-Cerca S., Kiburu I.N., Thomson E., LaRonde-LeBlanc N., Hurt E., *Dominant Rio1 kinase/ATPase catalytic mutant induces trapping of late pre-40S biogenesis factors in 80S-like ribosomes*, Nucleic Acids Research, 42 (2014), s. 8635-8647
6. Gianoncelli A., Cozza G., Orzeszko A., Meggio F., Kazimierczuk Z., Pinna L.A., *Tetraiodobenzimidazoles are potent inhibitors of protein kinase CK2*, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 17 (2009), s. 7281-7289
7. Hafen E., Kinases and phosphatases--a marriage is consummated, Science, 280 (1998), s. 1212-1213
8. Hessenauer A., Schneider C.C., Götz C., Montenarh M., *CK2 inhibition induces apoptosis via the ER stress response*, Cell Signal, 23 (2011), s. 145-151
9. Kiburu I.N., LaRonde-LeBlanc N., Interaction of Rio1 kinase with toyocamycin reveals a conformational switch that controls oligomeric state and catalytic activity, PLoS One, 7 (2012), e37371
10. LaRonde-LeBlanc N., Guszczynski T., Copeland T., Wlodawer A., Autophosphorylation of Archaeoglobus fulgidus Rio2 and crystal structures of its nucleotide-metal ion complexes, FEBS Journal, 272 (2005), s. 2800-2810
11. LaRonde-LeBlanc N., Wlodawer A., A family portrait of the RIO kinases, The Journal of Biological Chemistry, 280 (2005), s. 37297-37300
12. LaRonde-LeBlanc N., *Development of novel molecular probes of the Rio1 atypical protein kinase*, Biochimica et Biophysica Acta, 1834 (2013), s. 1292-1301
13. Manning G., Whyte D.B., Martinez R., Hunter T., Sudarsanam S., *The protein kinase complement of the human genome*, Science, 298 (2002), s. 1912-1934
14. Mielecki M., Krawiec K., Kiburu I.N., Grzelak K., Zagórski W., Kierdaszuk B., Kowa K., Fokt I., Szymanski S., Swierk P., Szeja W., Priebe W., Lesyng B., LaRonde-LeBlanc N., *Development of novel molecular probes of the Rio1 atypical protein kinase*, Biochimica et Biophysica Acta, 1834 (2013), s. 1292-1301
15. Pagano M.A., Andrzejewska M., Ruzzene M., Sarno S., Cesaro L., Bain J., Elliott M., Meggio F., Kazimierczuk Z., Pinna L.A., *Optimization of protein kinase CK2 inhibitors derived from 4,5,6,7-tetrabromobenzimidazole*, Journal of Medicinal Chemistry, 47 (2004), s. 6239-6247
16. Pagano M.A., Meggio F., Ruzzene M., Andrzejewska M., Kazimierczuk Z., Pinna L.A., *2-Dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazole: a novel powerful and selective inhibitor of protein kinase CK2*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 321 (2004), s. 1040-1044

17. Pagano M.A., Bain J., Kazimierczuk Z., Sarno S., Ruzzene M., Di Maira G., Elliott M., Orzeszko A., Cozza G., Meggio F., Pinna L.A., *The selectivity of inhibitors of protein kinase CK2: an update*, *Biochemical Journal*, 415 (2008), s. 353-365
18. Ruggero D., Pandolfi P.P., *Does the ribosome translate cancer?*, *Nature Reviews Cancer*, 3 (2003), s. 179-192
19. Sarno S., Papinutto E., Franchin C., Bain J., Elliott M., Meggio F., Kazimierczuk Z., Orzeszko A., Zanotti G., Battistutta R., Pinna L.A., *ATP site-directed inhibitors of protein kinase CK2: an update*, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 11 (2011), s. 1340-1351
20. Turowski T.W., Lebaron S., Zhang E., Peil L., Dudnakova T., Petfalski E., Granneman S., Rappsilber J., Tollervey D., *Rio1 mediates ATP-dependent final maturation of 40S ribosomal subunits*, *Nucleic Acids Research*, 42 (2014), s. 12189-12199
21. Vanrobays E., Gleizes P.E., Bousquet-Antonelli C., Noaillac-Depeyre J., Caizergues-Ferrer M., Gélugne J.P., *Processing of 20S pre-rRNA to 18S ribosomal RNA in yeast requires Rrp10p, an essential non-ribosomal cytoplasmic protein*, *The EMBO Journal*, 20 (2001), s. 4204-4213
22. Vanrobays E., Gélugne J.P., Gleizes P.E., Caizergues-Ferrer M., *Late cytoplasmic maturation of the small ribosomal subunit requires RIO proteins in Saccharomyces cerevisiae*, *Molecular and Cellular Biology*, 23 (2003), s. 2083-2095
23. Walkowiak B., *Techniki Chromatografii Cieczowej. Przykłady zastosowań*, Amersham Pharmacia Biotech, Warszawa (2000), s. 31-32, 34
24. Yde C.W., Frogne T., Lykkesfeldt A.E., Fichtner I., Issinger O.G., Stenvang J., *Induction of cell death in antiestrogen resistant human breast cancer cells by the protein kinase CK2 inhibitor DMAT*, *Cancer Letters*, 256 (2007), s. 229-237
25. Zandomeni R., Zandomeni M.C., Shugar D., Weinmann R., *Casein kinase type II is involved in the inhibition by 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole of specific RNA polymerase II transcription*, *The Journal of Biological Chemistry*, 261 (1986), s. 3414-3419

Zastosowanie filtracji żelowej do określania mechanizmu działania inhibitora na kinazę, na przykładzie pochodnej benzimidazolu i nietypowej kinazy Rio1

Streszczenie

Białko Rio1, jest enzymem zaliczanym do grupy nietypowych kinaz serynowych. Jest to konserwatywny enzym występujący u wielu organizmów: od archeowców, po wielokomórkowe organizmy eukariotyczne. Rio1 bierze udział w formowaniu podjednostek 40S rybosomów, a delecja genu kodującego to białko jest dla komórki letalna. Jedną z gałęzi badań nad Rio1 jest poszukiwanie nowych niskocząsteczkowych inhibitorów tego enzymu. Pierwszym takim związkiem była toyokamycyna, związek posiadający właściwości antybiotyczne, przeciwwirusowe i cytotoksyczne. Uzyskane przez nas dane wskazują na benzimidazolowe inhibitory kinazy białkowej CK2, jako pierwsze typowo ATP-kompetycyjne inhibitory kinazy Rio1. Zastosowanie filtracji żelowej pozwala zbadać mechanizm działania inhibitora na kinazę Rio1 i określić jego wpływ na strukturę IV-rzędową enzymu. Przeprowadzone przez nas badania pozwoliły wykazać różnice między wpływem Tojokamycyny, która promuje oligomeryzację kinazy, a pochodną benzimidazolu, która takiego wpływu na wykazuje. Wyniki te uzyskane z zastosowaniem techniki filtracji żelowej, dostarczają istotnych danych, które pozwalają określić mechanizm działania inhibitora na kinazę.

Słowa kluczowe: kinaza Rio1, filtracja żelowa, benzimidazol, Tojokamycyna

Applicatioin of gel filtration to determine the mechanism of action of the kinase inhibitor in example of the benzimidazole derivative and atypical kinase Rio1

Abstract

Rio1 protein is an enzyme classified to atypical serine kinases. It is a conserved enzyme found in many organisms: from archaea, to multicellular eukaryotic organisms. Rio1 mediates in the formation of 40S ribosomal subunits, and the deletion of the gene encoding this protein is lethal for the cell. One of the branches of research on the Rio1 is searching for new low mollecular inhibitors of this enzyme. The first compound was toyocamycin, a compound with antibiotic, antiviral and cytotoxic properties. Results obtained by us suggest benzimidazole inhibitors of protein kinase CK2, as the first strict ATP-competitive inhibitors of Rio1 kinase. The use of gel filtration tests the mechanism of action of the inhibitor to Rio1 kinase and to determine its effect on the quaternary structure of the enzyme. Our research allowed to demonstrate the differences between the effects of Toyocamycin, which promotes oligomerization of kinase, and the benzimidazole derivative which do not shows such effects. These results obtained by the gel filtration technique, provide relevant information to help determine the mechanism of action of the kinase inhibitor.

Keywords: Rio1 kinase, gel filtration, benzimidazole, Toyocamycin

Indeks autorów

| | | | |
|-------------------------|--------|---------------------|-----|
| Adamczyk R. | 106 | Korzekwa K..... | 237 |
| Adamek E. | 106 | Kotowska U..... | 23 |
| Aniołek A..... | 61 | Kubiński K..... | 249 |
| Baran W. | 106 | Kuczyńska B. | 167 |
| Barchewicz K. | 214 | Kutyła M..... | 197 |
| Borsuk A. | 142 | Masłyk M..... | 249 |
| Cholewiński M. | 106 | Nowaczyk P..... | 237 |
| Cielecka-Piontek J..... | 186 | Nowak D..... | 37 |
| Czerewko K. | 50 | Nowak J. | 37 |
| Dyrda G..... | 214 | Paczkowska M. | 186 |
| Fiedurek J..... | 197 | Puppel K. | 167 |
| Gałązka A..... | 70, 96 | Radzikowski D. | 229 |
| Gałązka R..... | 70, 96 | Rusinek P..... | 197 |
| Gawroński M. | 84 | Serafin W..... | 167 |
| Goede A. | 84 | Skubij N..... | 177 |
| Grata K. | 7 | Trzcíński M. | 37 |
| Gutowska K. | 84 | Tyczka P. | 249 |
| Jakubczak K..... | 126 | Wąsik T. J..... | 126 |
| Jakubczyk K..... | 214 | Wiczling P. | 142 |
| Jędrzejewski K..... | 197 | Wilk J..... | 106 |
| Kania M..... | 126 | Wojtyczka R. D..... | 126 |
| Kapelewska J. | 23 | Zawiła T..... | 126 |
| Karpińska J..... | 23 | | |