

Ocena aktywności zewnątrzkomórkowych oksydoreduktaz w hodowlach szczepu *Bjerkandera adusta* CCBAS 930 z dodatkiem doksorubicyny

Rybczyńska-Tkaczyk K., Kornilowicz-Kowalska T.,

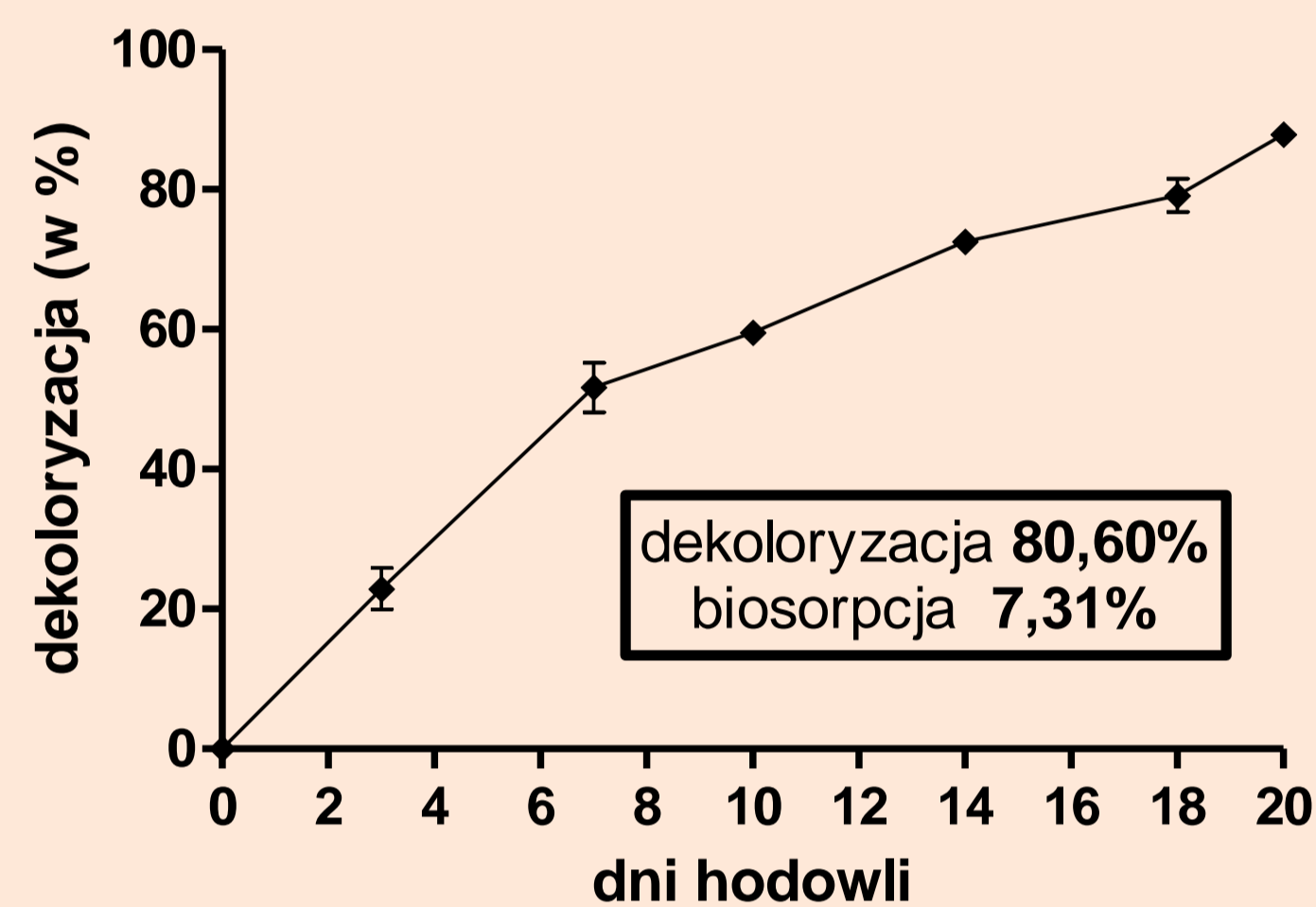
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Katedra Mikrobiologii Środowiskowej, Pracownia Mikologiczna, ul. Leszczyńskiego 7, 20-069 Lublin

Wstęp

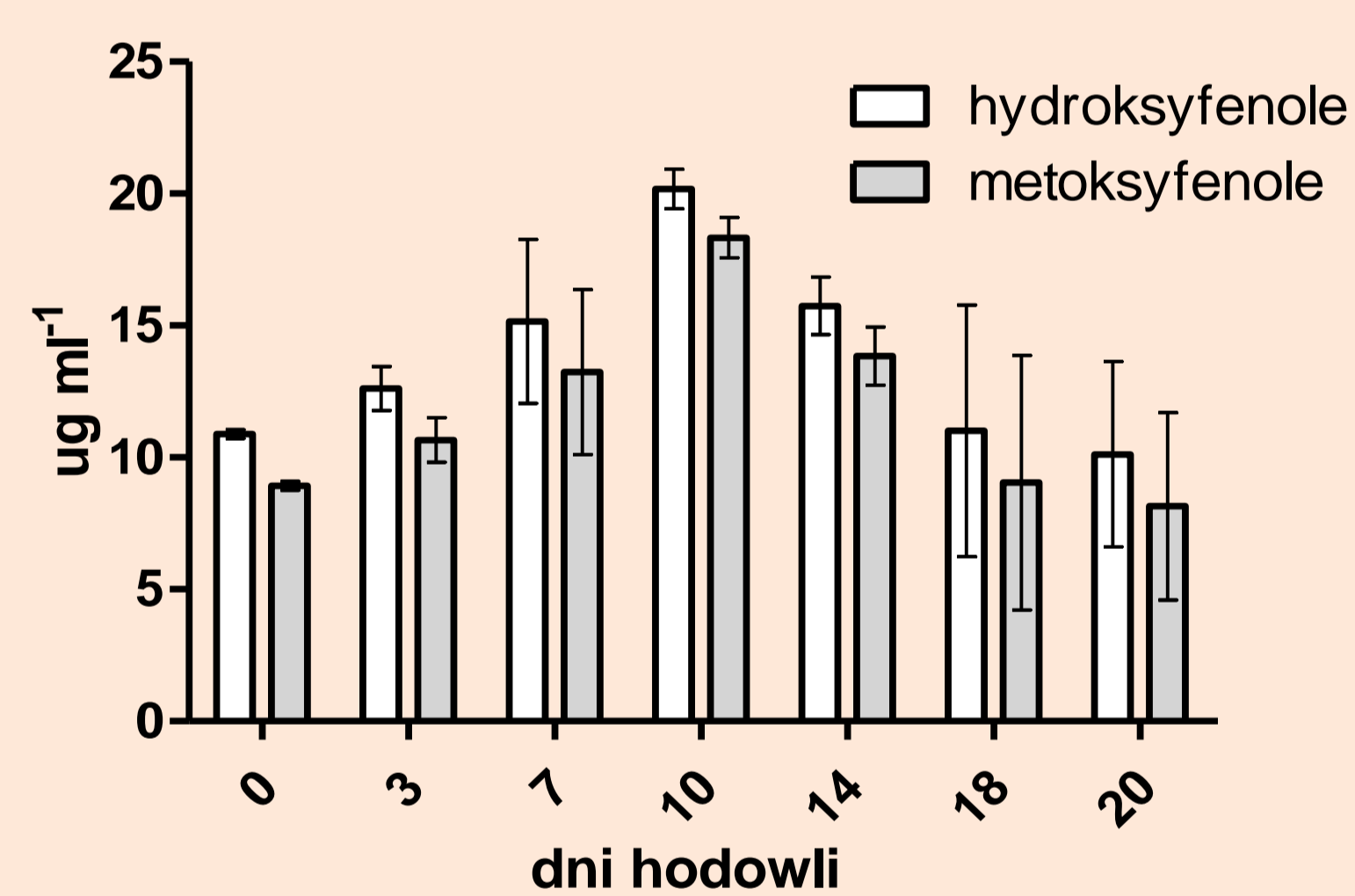
W ostatnich latach wzrasta produkcja i zużycie leków przeciwnowotworowych a tym samym zawartość tych farmaceutyków lub ich metabolitów w ściekach. Cytostatyki wykazują wysoką odpornością na czynniki środowiska, właściwości kancerogenne oraz mutagenne. Zwiększona trwałość farmaceutyków utrudnia ich całkowitą degradację podczas procesów oczyszczania ścieków oraz przyczynia się do ich akumulacji w środowisku. Pozostałości tych leków mogą przedostawać się do wód powierzchniowych oraz podziemnych co zagraża zarówno organizmom wodnym jak i zdrowiu człowieka. W ostatnich latach znaczenie zyskują biologiczne metody usuwania zanieczyszczeń z wykorzystaniem mikroorganizmów, które stanowią alternatywę lub uzupełnienie dotychczas stosowanych konwencjonalnych metod fizykochemicznych. Obiecujące pod tym względem są szczególnie tzw. grzyby białej zgnilizny drewna (*Basidiomycetes*).

Cel pracy

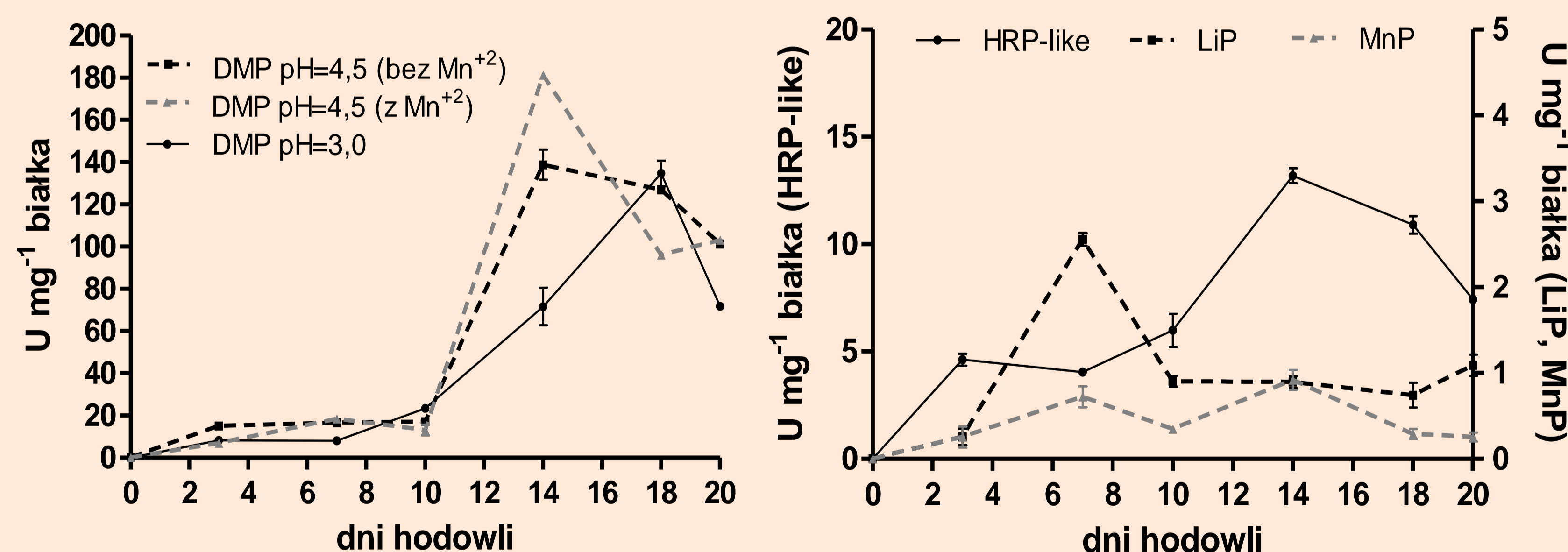
Celem niniejszej pracy była ocena aktywności zewnątrzkomórkowych oksydoreduktaz w hodowlach podstawczaka białej zgnilizny drewna *Bjerkandera adusta* CCBAS 930 z dodatkiem doksorubicyny.



Rys. 2. Biotransformacja doxorubicyny (10ug/ml) w stacjonarnych hodowlach płynnych szczepu *B. adusta* CCBAS 930



Rys. 4. Zawartość związków fenolowych w hodowlach szczepu *B. adusta* CCBAS 930 z dodatkiem doksorubicyny (10ug/ml)



Rys.3. Aktywność zewnątrzkomórkowych peroksydaz w hodowlach *B. adusta* CCBAS 930 z dodatkiem doksorubicyny (10ug/ml)

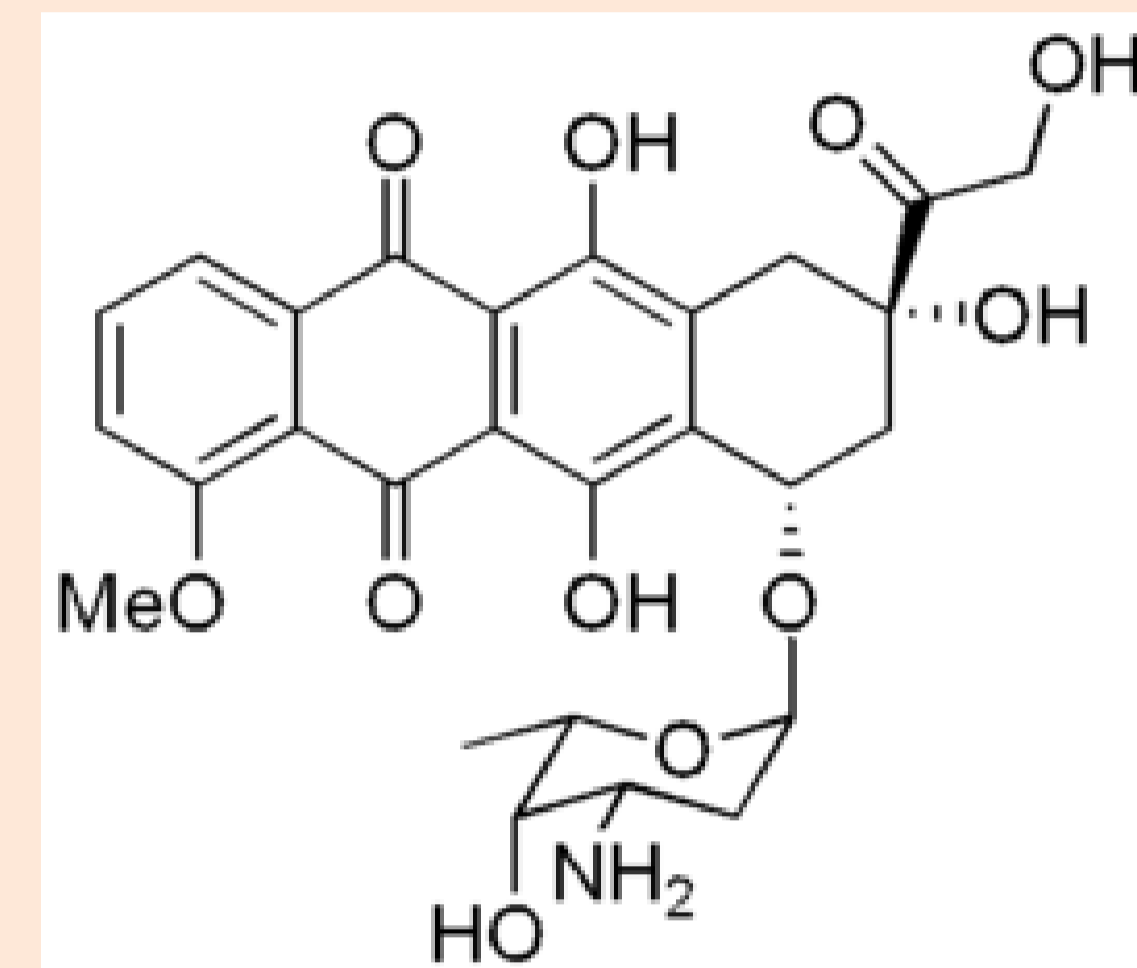
Materiał i metody

Szczep grzyba

W badaniach wykorzystano anamorficzny stadium podstawczaka białej zgnilizny drewna *B. adusta* CCBAS 930 wyizolowane z czarnej ziemi.

Doksorubicyna

Doksorubicyna jest antybiotykiem antracyklinowym zawierającym trzy pierścienie aromatyczne, w tym dwa o charakterze hydrochinonu oraz jedną grupę metoksyłową (Rys.1). Wykorzystywana jest w leczeniu chorób nowotworowych.



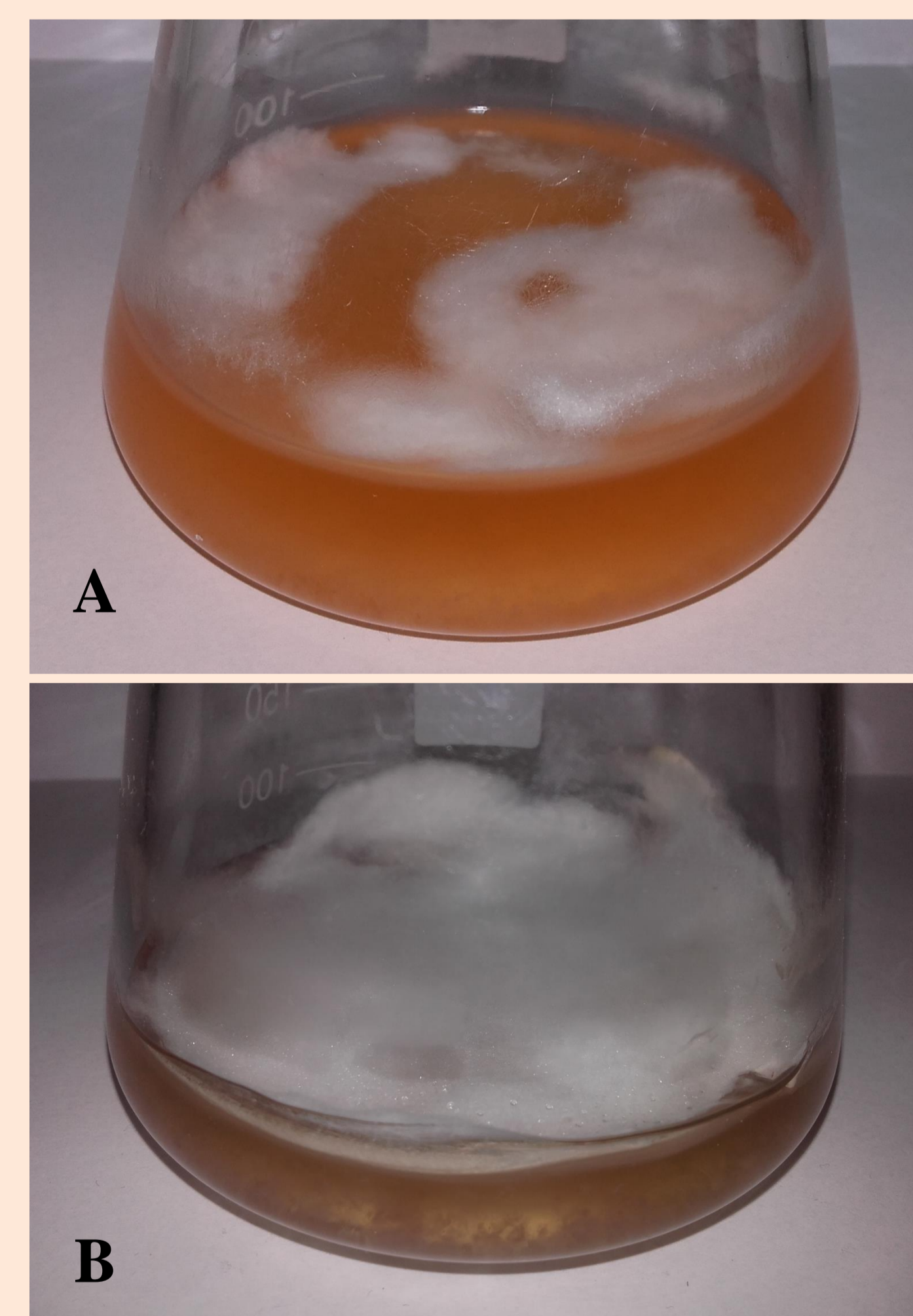
Rys. 1. Struktura chemiczna doksorubicyny

Warunki hodowli

Ocenę aktywności dekoloryzacyjnej szczepu *B. adusta* CCBAS 930 badano w warunkach statycznych (20 dni, 26°C) stosując 100ml płynnego podłoża mineralnego wzbogaconego 0,25% glukozą z dodatkiem doxorubicyny (10 µg/ml). Inokulum stanowił 1ml (10⁵ j.t.k ml⁻¹) homogenizowanej grzybni *B. adusta* CCBAS otrzymanej z płynnej 7-o dniowej hodowli na podłożu maltozowym.

Analizy biochemiczne

W klarownych płynach pochodzących okresowo oznaczano stopień dekoloryzacji (w %) doxorubicyny (A_{480nm}), zawartość białka, poziom związków hydroksyl- i metoksyfenolowych oraz aktywność peroksydaz: podobnej do chrzanowej (HRP-like), ligninowej (LiP), manganozależnej (MnP) oraz uniwersalnej (VP) mierzonej w obecność lub bez dodatku jonów Mn²⁺. Stopień zaabsorbowanej doxorubicyny oznaczono po zakończeniu doświadczenia.



Fot.1. Wzrost grzyba *B. adusta* CCBAS 930 na podłożu płynnym z dodatkiem doksorubicyny (10ug/ml) (A - hodowla 7-o dniowa; B - hodowla 20-o dniowa)

Ważniejsze wyniki i wnioski:

- W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że anamorficzny szczep podstawczaka białej zgnilizny drewna *B. adusta* CCBAS 930 usuwa doksorubicynę zarówno na drodze dekoloryzacji enzymatycznej jak i biosorpcji (Rys.2, Fot.1)
- W hodowlach *B. adusta* CCBAS 930 z dodatkiem doksorubicyny stwierdzono aktywność peroksydaz: HRP-like, LiP, MnP oraz VP (Rys.3)
- Zawartość związków fenolowych w hodowlach szczepu *B. adusta* CCBAS 930 rosła do 10 dnia, w drugim tygodniu badań odnotowano spadek zawartość związków fenolowych (Rys.4)
- W hodowlach szczepu *B. adusta* CCBAS 930 z dodatkiem doksorubicyny, najwyższymi aktywnościami charakteryzowała się peroksydaza HRP-like oraz VP z dodatkiem jonów Mn²⁺, których maksimum aktywności odnotowano 14 dnia hodowli, odpowiednio 13,20 oraz 181,20 U/mg⁻¹ białka (Rys.3)