



## **Biotransformacja i detoksykacja ksenobiotyków oraz związków pochodzenia naturalnego przez grzyby mikroskopowe**

Jerzy Długoński, Katarzyna Lisowska, Katarzyna Paraszkiwicz, Mirosława Słaba, Przemysław Bernat

Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii, Uniwersytet Łódzki, Łódź

### **Biodegradation and detoxification of xenobiotics and compounds of natural origin**

#### Summary

Microscopic fungi are widely used for synthesis and transformation of biologically active compounds e.g. antibiotics, corticosteroids and androgens. The fungal strains applied for steroid hormone production are also able to attack pollutants, including deleterious xenobiotics e.g. polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), chlorophenols or organotins to less toxic derivatives. Transformation, detoxification, and degradation of both types of hydrophobic substrates (steroids and xenobiotics), as well as heavy metals recovery from industrial wastes, are in the center of interest of Department of Industrial Microbiology and Biotechnology. This paper is a short review on a possibility of application of industrial strains for environment protection and an introduction to our detailed presentations (1-4) on this subject, during the 2<sup>nd</sup> National Biotechnology Congress in Łódź.

#### Adres do korespondencji

Jerzy Długoński,  
Katedra Mikrobiologii  
Przemysłowej  
i Biotechnologii,  
Uniwersytet Łódzki,  
ul. Banacha 12/16,  
90-237 Łódź.

#### Key words:

fungi, biodegradation, detoxification, heavy metals, xenobiotics.

### **1. Wprowadzenie**

Drobnoustroje wykazują zdolność do przekształcania praktycznie wszystkich związków pochodzenia naturalnego, a także ksenobiotyków. Przemiany te odgrywają zasadniczą rolę w pro-

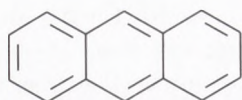
cesach obiegu pierwiastków, wykorzystywane są w wielu procesach biotechnologicznych do wytwarzania wielu cennych produktów, np. antybiotyków, leków steroidowych, enzymów. Mikroorganizmy mogą być także przyczyną poważnych strat gospodarczych, np. w wyniku psucia się żywności, czy biologicznej korozji różnych surowców i produktów, jak i służyć do rozkładu uciążliwych ksenobiotyków. Zarówno procesy korzystne, jak i szkodliwe z punktu widzenia człowieka, przeprowadzane są często przez te same gatunki, czy zespoły drobnoustrojów. Znajduje to swoje odzwierciedlenie w badaniach naukowych, zwłaszcza o charakterze aplikacyjnym. Z jednej strony ustala się warunki sprzyjające procesom degradacyjnym, a z drugiej poszukuje się coraz skuteczniejszych biocydów, ograniczających rozwój drobnoustrojów (1-4).

## 2. Biotransformacja steroidów i degradacja ksenobiotyków

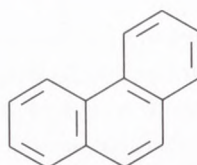
Związki steroidowe są substancjami cyklicznymi zawierającymi w swojej części uklad steranu (cyklopentanoperhydrofenantrenu) (rys). Powszechność występowania steroidów u *Eucaryota* powoduje, że substancje te są stosunkowo szybko utylizowane w środowisku naturalnym i relatywnie duża liczba gatunków jest zdolna do ich przekształcania, a nawet całkowitej degradacji. Niektóre z tych przemian, np. degradacja łańcucha bocznego steroli, 11 $\beta$ - i 16 $\alpha$ -hydroksylacja są wykorzystywane do mikrobiologicznej produkcji leków steroidowych (5,6).

W przeprowadzonych przez nas badaniach nad zdolnością grzybów transformujących steroidy do biokonwersji cyklicznych związków niesteroidowych wykazaliśmy, że szczepy aktywnie hydroksylujące korteksolon transformują również antracen (7) (zestawienie). Największą aktywność wykazywał szczep *Cunninghamella elegans* IM 1785 oraz jego mutanty IM 1785/21Gp oraz 1785/10Gi. Szczepy te były również najwydajniejsze w eliminacji fenantrenu z podłoża. Szczep IM 1785/21Gp jest obiektem intensywnych badań nad powiązaniem między mechanizmami regulującymi 11-hydroksylację kortykosteroidów i transformację fenantrenu, z udziałem cytochromu P-450 (8). Zagadnienia te były przedmiotem osobnego doniesienia na Kongresie (1).

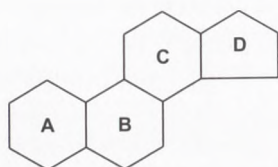
*C. elegans* IM 1785/21Gp będący modelem doświadczalnym w badaniach nad jednoczesnym przekształcaniem kortykosteroidów i WWA jest również zdolny do degradacji niecyklicznych ksenobiotyków. Grzyb ten degraduje trójbutylocynę (TBT), z wytworzeniem dwubutylocyny (DBT) i monobutylocyny (MBT), przy stężeniu wyjściowym ksenobiotyku 10 mg/l, i wydajności 70%, po 7 dniach inkubacji (9). W procesie tym podobnie jak w transformacji kortykosteroidów i WWA, uczestniczy cytochrom P-450 (10, 2). Badania te zostały szerzej przedstawione w (4).



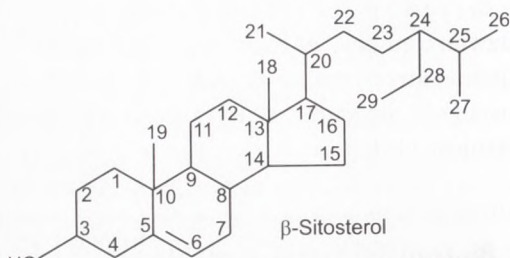
Antracen



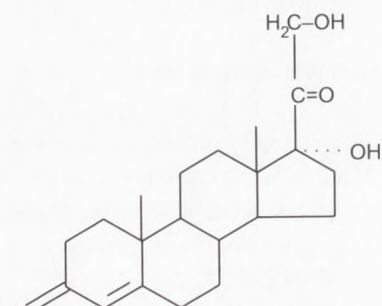
Fenantren



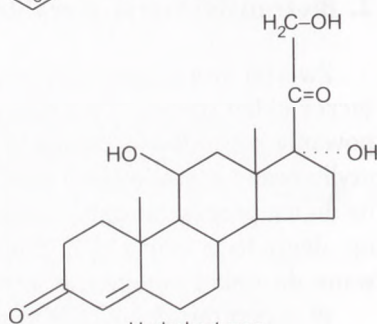
Steran



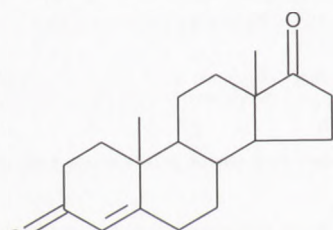
$\beta$ -Sitosterol



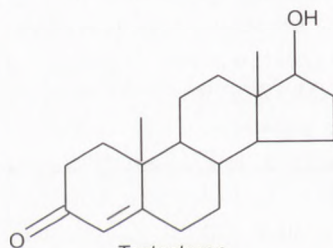
Korteksolon



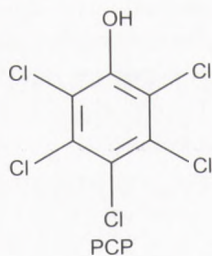
Hydrokortyzon



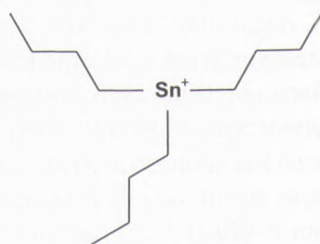
Androstendion



Testosteron



PCP



Trójbutylocyna

Rys. Wzory strukturalne wybranych steroidów i ksenobiotyków.

## Zestawienie

Szczepy grzybów mikroskopowych aktywnie hydroksylujących kortykostroidy, zdolne do przekształcania antracenu i fenantrenu (7,8)

---

<i>Cylindrocladium simplex</i> IM 2358
<i>Cylindrocladium simplex</i> IM2358/650
<i>Monosporium olivaceum</i> IM 484
<i>Curvularia lunata</i> IM2901*
<i>Curvularia lunata</i> IM2901/366
<i>Curvularia tuberculata</i> IM4417
<i>Cunninghamella elegans</i> IM1785
<i>Cunninghamella elegans</i> IM1785/21Gp**
<i>Cunninghamella elegans</i> IM1785/10Gi

---

\* Szczep wytwarzający także biosurfaktant (14).

\*\* Szczep rozkładający również aktywnie organiczne związki cyny (10).

### 3. Detoksykacja ksenobiotyków oraz szkodliwych związków pochodzenia naturalnego

Zarówno substraty steroidowe, jak i ksenobiotyki mogą mieć niekorzystny wpływ na przekształcające je drobnoustroje. Znajduje to swoje odbicie zarówno w morfologii drobnoustrojów, jak i przebiegu krzywych wzrostu, zwłaszcza jeżeli substratami są ksenobiotyki o silnym działaniu bójącym, np. TBT, czy pentachlorofenol (PCP). Stężenie tych biocydów w podłożu wzrostowym rzędu 10 mg/l praktycznie całkowicie hamuje kiełkowanie zarodników *C. elegans* i *Mucor ramosissimus*. Niemniej jednak grzyby te są zdolne do ograniczonego wzrostu i przekształcania toksycznych substratów jeżeli są dodane do hodowli w drugiej połowie logarytmicznej fazy wzrostu.

Obserwacje mikroskopowe szkodliwego wpływu substratów na drobnoustroje rosnące w formie strzępek jest utrudnione, ze względu na naturalne zróżnicowanie morfologiczne strzępek, narastające wraz z wiekiem grzybni, a zwłaszcza wakuolizacją starszej części strzępek. Dogodnym obiektem do analizy toksycznego wpływu substratu na przekształcające je drobnoustroje są organizmy jednokomórkowe, a zwłaszcza drożdże rozsiewkowe *Schizosaccharomyces pombe*, nie wytwarzające w trakcie swojego cyklu komórkowego pączków. Drożdże te wykazują zdolność do redukcji grup ketonowych do wodorotlenowych, przekształcając androstendion (AD) i androstadiendion (ADD) odpowiednio do testosteronu (TS) i dehydrotestosteronu (DTS). Substraty, w przeciwieństwie do produktów reakcji, hamują podział komórek i stymulują powstawanie nieregularnych form komórkowych. Ściana komórkowa zmienionych drożdży jest mniej podatna na działanie enzymów litycznych (11). Podobnie zmienione morfologiczne kształty komórek występują u mutantów

*S. pombe*, u których występuje zaburzenie tworzenia przegrody poprzecznej, w trakcie podziału komórek. Przyпуска się, że tworzenie zniekształconych form komórkowych u drożdży rozsiewkowych spowodowane jest niezrównoważoną syntezą polimerów ściany komórkowej w miejscach, gdzie powstaje nowa przegroda (12,11).

Drobnoustroje przekształcające hydrofobowe ksenobiotyki mogą wytwarzać emulgatory, które sprzyjają utylizacji i/lub detoksykacji lipofilnych substratów (13). Jako przykład mogą posłużyć grzyby strzępkowe *Curvularia lunata*. Przemysłowy szczep *C. lunata* IM 2901, stosowany do produkcji hydrokortyzonu i transformujący antracen oraz fenantren, wytwarza substancje emulgujące oleje roślinne i mineralne (14). Sprzyja to wykorzystywaniu przez grzyb hydrofobowych substratów, jako źródła węgla i energii, a także chroni przed toksycznym wpływem biocydów, jak PCP czy TBT.

Wyodrębniony przez nas z przepracowanych chłodziw szczep grzybów nitkowatych *Mucor ramosissimus* IM 6203 jest zdolny do atakowania pentachlorofenolu (PCP) z wytworzeniem 2,3,5,6 tetrachlorochinonu (TeCH), jako produktu pośredniego degradacji ksenobiotyku. Wydajność utylizacji ulegała zwiększeniu, gdy grzyb ten rósł na podłożu zawierającym przepracowany olej samochodowy (15). Po 7 dniach hodowli odzyskiwano jedynie 8,3% PCP i 4,3% TeCH w stosunku do kontroli abiotycznej (stężenie wyjściowe biocydu 10 mg/l). Wzrost *M. ramosissimus* IM 62003 na podłożu zawierającym przepracowany olej i biocyd był powiązany z wytworzeniem przez grzyb substancji emulgujących olej, które sprzyjały wzrostowi szczepu oraz utylizacji ksenobiotyku (15).

#### 4. Usuwanie toksycznych metali i degradacja ksenobiotyków

W zanieczyszczonym środowisku, szkodliwym związkom organicznym towarzyszą często toksyczne metale ciężkie. Dotyczy to zarówno metali ciężkich, które nie uczestniczą w procesach życiowych, jak rtęć, ołów, srebro, złoto, antymon czy kadm, a także pierwiastków, które w małych ilościach są niezbędne dla prawidłowego przebiegu procesów fizjologicznych, a w większych zaburzają przemiany komórkowe, jak cynk, nikiel czy miedź. Należy podkreślić, że względna toksyczność niektórych metali ciężkich może być związana nie tylko z ich stężeniem w środowisku ale również zależy od szeregu czynników abiotycznych, jak potencjał oksydoredukcyjny, pH, temperatura otoczenia, obecność kationów innych metali itp.

Drobnoustroje występujące w środowisku mogą sprzyjać ich immobilizacji, jak i stymulować ich obieg w ekosystemach. Bakterie i grzyby wyodrębnione z różnych środowisk i wykorzystywane w procesach przemysłowych mogą być również wykorzystywane do usuwania metali z odpadów. Dotyczy to zwłaszcza biomasy stanowiącej kłopotliwy odpad technologiczny, która może być stosowana jako sorbent wiążący metale. W skład osłon komórkowych drobnoustrojów wchodzi liczne polimery jak lipopolisacharydy, mureina, chityna, chitozan, glukany, mannany, zawie-

rające liczne podstawniki (grupy hydroksylowe, karboksylowe, sulfhydrylowe) łatwo wiążące kationy. Niektóre przekształcenia związków hydrofobowych, w których uczestniczą układy enzymatyczne zawierające cytochrom P-450, sprzyjają zwiększeniu liczby grup sulfhydrylowych w strukturach powierzchniowych drobnoustrojów (16,17). Przykładem mogą być tutaj grzyby stosowane do produkcji leków steroidowych na drodze 11-hydroksylacji kortykosteroidów, których ściana komórkowa z powodzeniem wykorzystywana jest jako sorbent metali ciężkich (3,16).

Na szczególną uwagę zasługują drobnoustroje wyodrębnione ze środowisk silnie skażonych metalami, zwłaszcza przez długi okres, co sprzyja adaptacji mikroorganizmów do skażonego środowiska. Wyizolowany przez nas z odpadów poflotacyjnych (gromadzonych przez ponad 150 lat na hałdach wokół huty metali nieżelaznych) szczep grzybów nitkowatych *Verticillium marquandii* IM 6003 charakteryzuje się bardzo wysoką odpornością na metale ciężkie. Ponadto jest on zdolny do selektywnego wiązania (pobierania) cynku w obecności ołowiu, 84 mg/g suchej masy grzybni (18). Również pochodzący z tych odpadów szczep bakteryjny *Rhodococcus equi* IM 6KB3 może być wykorzystany zarówno do eliminacji metali ciężkich, jak i wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA). Unieruchomione komórki tego szczepu na szklanym filtrze membranowym aktywnie wiązały ołów oraz antracen, co wskazuje na możliwość ich użycia do szybkiego i skutecznego usuwania zanieczyszczeń metaloorganicznych ze ścieków przemysłowych (19).

## 5. Podsumowanie

W przedstawionych danych wskazuje się, że drobnoustroje stosowane w procesach przemysłowych mogą być również przydatne do eliminacji zanieczyszczeń, zwłaszcza jeżeli dotyczy to przekształceń z udziałem cyt P-450 – hemoproteidu wchodzącego w skład enzymów odpowiedzialnych za transformację steroidów i rozkład toksycznych ksenobiotyków.

W badaniach zarówno o charakterze podstawowym, jak i aplikacyjnym nad biodegradacją i detoksykacją ksenobiotyków zazwyczaj bierze się pod uwagę pojedyncze procesy zachodzące z udziałem czystych kultur. W warunkach naturalnych drobnoustroje stykają się z wieloma zanieczyszczeniami, zarówno organicznymi jak i metalami ciężkimi. W przypadku długotrwałego zanieczyszczenia środowiska, tak jak ma to miejsce na Śląsku, dochodzi do adaptacji drobnoustrojów do występujących warunków. Wyodrębnione stamtąd szczepy, często są zdolne do rozkładu toksycznych ksenobiotyków w obecności wysokich stężeń metali ciężkich i mogą stanowić podstawę do opracowania preparatów przydatnych szczególnie do usuwania uciążliwych zanieczyszczeń.

## Literatura

1. Lisowska K., Długoński J., (2003), *Biotechnologia*, 4, 92-100.
2. Paraszkiwicz K., Długoński J., (2003), *Biotechnologia*, 4, 82-91.
3. Słaba M., Długoński J., (2003), *Biotechnologia*, 4, 101-109.
4. Bernat P., Długoński J., (2003), *Biotechnologia*, 4, 69-81.
5. Mahato S. B., Garai S., (1997), *Steroids*, 62, 332-345.
6. Angelova B., Schmauder H. P., (1999), *J. Biotechnol.*, 67, 13-22.
7. Lisowska K., Długoński J., (1999), *J. Basic Microbiol.*, 39, 117-125.
8. Lisowska K., Długoński J., (2003), *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 85, 63-69.
9. Bernat P., Długoński J., (2002), *Biotechnol. Lett.*, 24, 1971-1974.
10. Vanden Bossche H., Koymans L., (1998), *Mycoses*, 41, 32-38.
11. Długoński J., Wilmańska D., (1998), *Anton. Leeuw. Int. J.*, 73, 189-194.
12. Mateos P., Dominguez A., (1991), *Anton. Leeuw. Int. J.*, 59, 155-165.
13. Banat I., Makkar R. S., Cameotra S. S., (2000), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53, 495-508.
14. Paraszkiwicz K., Kanwal A., Długoński J., (2002), *J. Biotechnol.*, 92, 287-294.
15. Szewczyk R., Bernat P., Milczarek K., Długoński J., (2003), *Biodegradation*, 14, 1-8.
16. Volesky B., (1994), *FEMS Microbiol. Rev.*, 14, 291-302.
17. Gadd G. M., (2001), *Biotechnology*, vol. 10, Ed. Rehm H. J., 225-264, John Wiley & Sons, New York.
18. Słaba M., Długoński J., (2000), *Biotechnol. Lett.*, 22, 1699-2000.
19. Fijałkowska S., Lisowska K., Długoński J., (1998), *J. Basic Microbiol.*, 38, 361-369.