

Kamila Wlizio✉

Jolanta Polak

Anna Jarosz-Wilkołazka

Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

✉Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin; tel.: (81) 537 50 51, e-mail: kamila.wlizio@poczta.umcs.lublin.pl

Artykuł otrzymano 30 października 2017 r.

Artykuł zaakceptowano 17 listopada 2017 r.

Słowa kluczowe: biokataliza, mikrozanieczyszczenia, związki endokrynnie czynne

Wykaz skrótów: BPA (ang. *BisPhenol A*) – bisfenol A; DCF (ang. *diclofenac*) – diklofenak; CBZ – (ang. *CarBamaZepine*); EDC (ang. *Endocrine Disruptor Compounds*) – związki endokrynnie czynne; HBT (ang. *HydroxyBenzoTriazole*) – hydroksybenzotriazol; NLPZ – niesteroidowe leki przeciwzapalne; OTC (ang. *OxyTetraCycline*) – oksytetracyklina; TC (ang. *TetraCycline*) – tetracyklina; TCS (ang. *TriCloSan*) – triklozan

Podziękowania: Praca współfinansowana przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu Preludium 9 (2015/17/N/NZ9/03647) i Sonata 11 (2016/21/D/NZ9/02460).

STRESZCZENIE

Produkowane w coraz większej ilości, nieprawidłowo składowane i nadmiernie używane farmaceutyki oraz inne substancje aktywne biologicznie przenikają bezpośrednio lub przedostają się ze ścieków do wód powierzchniowych, gruntowych i wody pitnej. Stanowią tym samym zagrożenie dla wielu organizmów żywych, w tym także dla człowieka, ze względu na zaburzenia równowagi hormonalnej dotyczącej głównie procesów rozrodczych lub poprzez zwiększanie lekooporności mikroorganizmów. Ze względu na skalę emisji oraz ograniczone możliwości rozkładu tych zanieczyszczeń metodami fizykochemicznymi, konieczne jest opracowanie nowych i wydajnych procesów ich eliminacji ze środowiska. Jednym z proponowanych rozwiązań jest stosowanie narzędzi oferowanych przez współczesną biotechnologię. Proces biokatalizy umożliwi rozkład szerokiej gamy związków biologicznie aktywnych, między innymi przy zastosowaniu enzymów o niskiej specyficzności substratowej i działających w przyjaznych środowisku warunkach reakcji, np. lakazy grzybowej. Ostatnie badania wskazują na skuteczność stosowanych metod biokatalitycznych w usuwaniu zanieczyszczeń o zróżnicowanej budowie chemicznej, z utworzeniem nietoksycznych metabolitów.

WPROWADZENIE

Rozwój współczesnego przemysłu oraz stale rosnące tempo życia są czynnikami, które nie pozostają obojętne dla środowiska naturalnego. Wśród wielu różnych zanieczyszczeń generowanych przez rozwijającą się gospodarkę można znaleźć tzw. mikrozanieczyszczenia, czyli śladowe stężenia substancji biologicznie czynnych, które coraz śміiej uważa się za główną przyczynę wymierania organizmów. Przeważającą część tego typu zanieczyszczeń stanowią różne grupy farmaceutyków, w tym łatwo dostępne leki bez recepty. Dużym zagrożeniem dla organizmów żywych są między innymi związki zakłócające prawidłowe funkcjonowanie układu hormonalnego (EDC, ang. *Endocrine Disruptor Compounds*), obecne w różnego rodzaju wyrobach codziennego użytku wykonanych z tworzyw sztucznych, w tym w opakowaniach na żywność [1]. Dodatkowym problemem jest mało efektywna degradacja związków biologicznie aktywnych z zastosowaniem metod fizykochemicznych, spowodowana różnorodnością ich budowy chemicznej [2]. W związku z tym, wiele zespołów naukowych ukierunkowało swoje badania na opracowanie metod usuwania związków biologicznie aktywnych drogą biokatalizy, jako rozwiązania o większej wydajności. Bioprocessy oparte o działanie całych komórek mikroorganizmów mają pewne ograniczenia, głównie dotyczące utrzymania wzrostu i funkcji żywych komórek. Alternatywnym rozwiązaniem jest biokataliza oparta na działaniu wyizolowanych enzymów. W porównaniu do tradycyjnych metod degradacji zanieczyszczeń, jak również niektórych metod mikrobiologicznych, w trakcie procesów katalizowanych przez enzymy rzadko dochodzi do tworzenia toksycznych produktów ubocznych reakcji. Enzymy, zwłaszcza unieruchomione na nierozpuszczalnych nośnikach, wykazują także większą odporność na działanie niekorzystnych warunków reakcji, w tym rozpuszczalników organicznych czy surfaktantów, dodawanych w celu zwiększenia biodostępności zanieczyszczeń. Ponadto, dzięki metodom inżynierii genetycznej możliwe jest opracowanie enzymów rekombinowanych o zwiększonej stabilności i/lub aktywności, co dodatkowo obniża koszty procesu [3]. Biokataliza enzymatyczna jest wydajnym narzędziem w stosowanych procesach technologicznych, z których wiele opiera się głównie na działaniu enzymów z klasy hydrolaz. Na szczególną uwagę zasługują również enzymy z klasy oksydoreduktaz, które są używane w przemyśle tekstylnym i papierniczym, ale dzięki swojej uniwersalności mogą być także rozpatrywane jako katalizatory w procesach związanych z bioremediacją.

GRUPY I ŹRÓDŁA ZWIĄZKÓW BIOLOGICZNIE AKTYWNYCH W ŚRODOWISKU WODNYM

KLASYFIKACJA ZANIECZYSZCZEŃ

Zanieczyszczenia związkami biologicznie aktywnymi stanowią złożoną mieszaninę, farmaceutyków i innych związków syntetycznych o zróżnicowanej budowie chemicznej i właściwościach. Na stężenie tych związków w środowisku mają wpływ zarówno ograniczone możliwości ich rozkładu, ale także wysoka emisja spowodowana coraz większą konsumpcją, wynikającą z łatwej dostępności niektórych grup leków. Wśród tych związków znajdują się popularne leki bez recepty oraz terapeutyki często stosowane w określonych jednostkach chorobowych, jak również związki o działaniu biologicznym stanowiące zanieczyszczenia obecne m. in w wyrobach wykonanych z tworzyw sztucznych. Związki te możemy podzielić na następujące grupy [2,4]:

- niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ): stosowane w stanach przeziębienia i grypy leki przeciwbólowe i przeciwzapalne (ibuprofen, kwas acetylosalicylowy), stosowane typowo w stanach zapalnych mięśni i stawów oraz w chorobie reumatoidalnej (diklofenak, ketoprofen, naproksen);
- inne leki przeciwbólowe i przeciwgorączkowe: paracetamol;
- antybiotyki: sulfonamidy (trimetoprim, sulfametoksazol), makrolidy (erytromycyna, klatromycyna), aminoglikozydy (streptomycyna), fluorochinolony (ciprofloksacyna, norfloksacyna);
- β -blokery: atenolol, metoprolol, propranolol, stosowane w chorobach kardiologicznych takich jak choroba niedokrwienna serca, arytmia, nadciśnienie tętnicze;
- leki psychotropowe: karbamazepina, diazepam;
- leki regulujące gospodarkę lipidową będące pochodnymi kwasu fibrynowego (kwas kłofibrowy, bezafibrat, gemfibrozil), stosowane jako środki ograniczające syntezę kwasów tłuszczowych w wątrobie oraz syntezę cholesterolu;
- hormony płciowe (estrogeny): estron, 17β -estradiol, estriol (naturalne), etinyloestradiol (syntetyczny), stanowiące składnik środków antykoncepcyjnych i leków w hormonalnej terapii zastępczej;
- inne związki endokrynnie czynne (EDC): fito- i metaloestrogeny, pestycydy i związki syntetyczne (bisfenol A), które zaburzają prawidłowe funkcjonowanie układu hormonalnego.

ŹRÓDŁA ZANIECZYSZCZEŃ

Źródła związków biologicznie aktywnych w środowisku wodnym można podzielić na trzy grupy: (1) ścieki, (2) składowiska odpadów i (3) odcieki z gospodarstw rolnych

bezpośrednio trafiające do wód gruntowych. Do pierwszej grupy, mającej największy wpływ na emisję zanieczyszczeń, zaliczane są ścieki przemysłowe, a przede wszystkim ścieki komunalne, zawierające leki wydalone z organizmu w formie niezmienionej lub w postaci metabolitów powstałych na drodze detoksykacji zachodzącej w organizmach żywych (Tab. 1).

Podczas procesu detoksykacji w organizmie ludzkim, pewna część dawki leku ulega przemianom metabolicznym I i II fazy, które przekształcają substancję z lipofilowej, niepolarniej i wolniej wydalanej formy, w mniej toksyczną formę hydrofilową i polarną, łatwą do usunięcia z organizmu [6,7]. Do fazy I zaliczane są procesy utleniania, redukcji i hydrolizy, natomiast w fazie II dochodzi do sprzęgania powstających substancji ze związkami endogennymi obecnymi w organizmie, np. z kwasem glukuronowym i utworzenia metabolitów wydalanych następnie z moczem lub żółcią. W pewnych warunkach, produkty sprzęgania mogą ponownie przekształcić się do formy wyjściowej leku stwarzając zagrożenie dla środowiska [2,6]. Część leku nie jest metabolizowana i jako taka jest usuwana z organizmu, a następnie trafia do ścieków i wód gruntowych. Na obecność farmaceutyków w ściekach komunalnych ma także wpływ nieprawidłowa utylizacja przeterminowanych leków, wyrzucanych do umywalk czy toalet. Szczególnym przypadkiem ścieków komunalnych są ścieki szpitalne, w których stężenie różnego rodzaju farmaceutyków jest znacznie większe w porównaniu ze stężeniami emitowanymi z gospodarstw domowych [4]. Standardowe oczyszczalnie nie są przystosowane do usuwania tego typu śladowych zanieczyszczeń, w związku z czym, leki trafiają do środowiska wodnego wprost z oczyszczalni lub są składowane na wysypiskach jako osad ściekowy i stanowią kolejne źródło zanieczysz-

Tabela 1. Wykaz metabolitów niesteroidowych leków przeciwzapalnych powstających podczas biotransformacji w organizmie człowieka (na podstawie: [5]).

Substancja wyjściowa	Metabolity powstałe podczas biotransformacji
diklofenak	4-hydroksydiklofenak
	5-hydroksydiklofenak
ibuprofen	1-hydroksyibuprofen
	2-hydroksyibuprofen
	1,2-hydroksyibuprofen
	ibuprofenol octan ibuprofenolu
ketoprofen	kwas 2-(3-benzoilo-4-hydroksyfenilo)propanowy
	kwas 2-[(3-hydroksy(fenilo)metylo]propanowy
	kwas 2-[(3-(4-hydroksybenzoilo)fenilo]propanowy
	kwas 3-(hydroksykarboksymetylo)hydratropowy kwas 3-(ketokarboksymetylo)hydratropowy
naproksen	6-O-desmetylonaproksen
	siarczan 6-O-desmetylonaproksen

czeń związkami biologicznie aktywnym [1]. Roczną ilość odpadów w postaci leków, trafiających na wysypiska w Polsce szacuje się na ponad 5 tysięcy ton. Oprócz nich, wysypiska są głównym źródłem zanieczyszczeń związkami endokrynnie czynnymi, na czele z bisfenolem A (BPA), który jest powszechnie stosowany w produkcji wyrobów plastikowych typu PET z poli(tetraftalanu etylenu). Trzecim źródłem zanieczyszczeń związkami biologicznie aktywnymi są gospodarstwa rolne, w których stosuje się między innymi naturalne nawozy pochodzenia zwierzęcego. Leki weterynaryjne wydalone są przez zwierzęta hodowlane i w ten sposób dostają się do gleby i do wód gruntowych [1,7]. Zaobserwowano istnienie zjawiska sezonowości występowania zanieczyszczeń ścieków związkami biologicznie aktywnymi, polegającej na obniżeniu ich stężenia latem i wzroście stężenia w okresie jesienno-zimowym. Zjawisko to ma związek z szybszym tempem degradacji zanieczyszczeń w okresie letnim, wynikającym z podwyższonej temperatury ścieków oraz zwiększonym stopniem fotolizy substancji wrażliwych

na działanie światła słonecznego. Drugim czynnikiem wpływającym na sezonowość emisji, jest zwiększone stosowanie niektórych środków, głównie NLPZ, jesienią i zimą, czyli w okresie podwyższonej zachorowalności na przeziębienie i grypę [5]. Stężenie określonych grup zanieczyszczeń w ściekach, wodach gruntowych i wodzie pitnej, jest również zmienne w zależności od badanego kraju oraz jego regionu (Tab. 2a, 2b).

WPLYW NA ORGANIZMY ŻYWE

Szereg substancji znajdujących się w ściekach i innych odpadach przedostając się do środowiska, stanowi zagrożenie nie tylko dla organizmów zamieszkujących wody powierzchniowe, ale także dla zwierząt i ludzi korzystających z zanieczyszczonych zasobów wody pitnej. Szkodliwe działanie związków biologicznie aktywnych zaczyna się już na poziomie mikroorganizmów. Przykładem są cyjanobakterie, które są organizmami bardzo wrażliwymi na działanie antybiotyków, między innymi tetracyklin, amoksycyliny czy spiramycyny [5]. Oprócz

Tabela 2a. Wykaz przykładowych związków biologicznie aktywnych w ściekach, wodach powierzchniowych i wodzie pitnej.

Grupa terapeutyczna	Związek	Źródło	Stężenie [ng/l]	Kraj	Piśmiennictwo
antybiotyki	amoksycylina	wody powierzchniowe	<2,08–9,91	Włochy	[8]
	cefaleksyna	ścieki surowe	4600	Australia	[9]
	ciprofloksacyna	ścieki surowe	3800	Australia	[9]
		wody powierzchniowe	4,7–54,2	USA (rzeka Tennessee)	[10]
	cefaklor	ścieki surowe	500	Australia	[9]
	erytromycyna	wody powierzchniowe	0,78–8,12	Włochy	[8]
	norfloksacyna	wody powierzchniowe	10–140	Francja (Sekwana)	[11]
	ofloksacyna	wody powierzchniowe	50	Hiszpania (Walencja)	[12]
			10–20	Francja (Sekwana)	[11]
	sulfametoksazol	ścieki surowe	1,83–11,40	Włochy	[8]
			360*	Australia	[9]
	wody powierzchniowe		10–155	Francja (Sekwana)	[11]
			3,1–33	USA (rzeka Tennessee)	[10]
	trimetoprim	ścieki surowe	340	Australia	[9]
wody powierzchniowe		10–20	Francja (Sekwana)	[11]	
		2,3–63,3	USA (rzeka Tennessee)	[10]	
	triklozan	woda pitna	734	USA	[13]
β-blokery	atenolol	wody powierzchniowe	318–6167	Hiszpania (Madryt)	[14]
	metoprolol	wody powierzchniowe	25–76	Hiszpania (Madryt)	[14]
	propranolol	wody powierzchniowe	15–117	Hiszpania (Madryt)	[14]
NLPZ	diklofenak	ścieki surowe	3,7–17,1	Czechy	[15]
		wody powierzchniowe	313–3363	Hiszpania (Madryt)	[14]
		woda pitna	17–486	Polska	[16]
			6–35	Niemcy	[13]
	ibuprofen	wody powierzchniowe	117	Hiszpania (Walencja)	[12]
			2234–16886	Hiszpania (Madryt)	[14]
		wody powierzchniowe	12–76	Polska	[16]
		ścieki surowe	13,2–45,9	Czechy	[15]
		woda pitna	3	Niemcy	[13]
		woda pitna	8,5	Finlandia	[13]
	naproksen	ścieki surowe	0,5–3,4	Czechy	[15]
		wody powierzchniowe	387–3140	Hiszpania (Madryt)	[14]
			25–87	Polska	[16]
kwasy acetylosalicylowy	ścieki surowe	0,4–2,1	Czechy	[15]	
ketoprofen	ścieki surowe	0,4–3,8	Czechy	[15]	

*stężenie podane w µg/l

Tabela 2b. Wykaz przykładowych związków biologicznie aktywnych w ściekach, wodach powierzchniowych i wodzie pitnej.

Grupa terapeutyczna	Związek	Źródło	Stężenie [ng/l]	Kraj	Piśmiennictwo
NLPZ	ketoporfen	wody powierzchniowe	43-1567	Hiszpania (Madryt)	[14]
	ketoprofen	wody powierzchniowe	6-47	Polska	[16]
Leki regulujące gospodarkę lipidową	bezafibrat		234-2315	Hiszpania (Madryt)	[14]
	kwas klofibrowy	wody powierzchniowe	24-185	Hiszpania (Madryt)	[14]
	gemfibrozil		1113-5192	Hiszpania (Madryt)	[14]
Leki przeciwbólowe i przeciw-gorączkowe	paracetamol		117	Hiszpania (Walencja)	[12]
		wody powierzchniowe	188-2813	Hiszpania (Madryt)	[14]
			2,1-12,3	USA (rzeka Tennessee)	[10]
		ścieki surowe	1,1-20,1	Czechy	[15]
	woda pitna	210,1	Francja	[13]	
kodeina	wody powierzchniowe	75	Hiszpania (Walencja)	[12]	
Leki psychotropowe	karbamazepina	wody powierzchniowe	2,9-23,1	USA (rzeka Tennessee)	[10]
		woda pitna	24	Kanada	[13]
		woda pitna	60	Niemcy	[13]
	diazepam	woda pitna	10	Wielka Brytania	[13]
		wody powierzchniowe	28,7-98,4	Portugalia	[17]
Związki endorkynnie czynne	bisfenol A		4-92	Niemcy	[17]
		woda pitna	0,099-0,317	Europa, Azja, Płn. Ameryka	[17]

bakterii, zanieczyszczenia mają negatywny wpływ na roślinność wodną, w przypadku której może dochodzić do wybielania chloroplastów lub zahamowania syntezy białek w wyniku działania streptomycyny [18]. W przypadku różnych gatunków glonów, toksyczny efekt, którego konsekwencją jest najczęściej zahamowanie wzrostu, obserwowano w przypadku działania takich substancji, jak karbamazepina, fluoksetyna (lek przeciwdepresyjny) oraz fibraty. Ze względu na fakt, że glony stanowią podstawę żywieniową wielu łańcuchów pokarmowych, ograniczenie ich liczebności może mieć poważne konsekwencje dla równowagi ekosystemów wodnych [5]. W przypadku drobnych organizmów bezkręgowych, toksyczny efekt działania związków biologicznie aktywnych dotyczy najczęściej rozwielitek (*Daphnia magna*), stanowiących ważny element zooplanktonu i będących jednym z organizmów modelowych w toksykologicznej ocenie jakości wody [19]. Efekt toksyczny wobec tego gatunku obserwowano w badaniach prowadzonych z zastosowaniem diklofenaku jak również propranololu oraz karbamazepiny, które działały także na wioślarki z gatunku *D. longispina*. Diklofenak jest związkiem wyróżniającym się pod względem wysokiej toksyczności wobec każdego organizmu wodnego. W przypadku kręgowców takich jak pstrąg tęczowy (*Oncorhynchus mykiss*) jego działanie polega głównie na poważnym uszkodzeniu wątroby, nerek i skrzel. Gatunek ten jest również bardzo wrażliwy na działanie naproksenu, karbamazepiny i metaprololu. Diklofenak okazał się toksyczny również wobec ciernika (*Gasterosteus aculeatus*) powodując zmiany obserwowane w obrazie histologicznym nerek [20]. Najczęstszym przykładem szkodliwego działania różnego rodzaju leków jest upośledzenie funkcji układu hormonalnego ryb, objawiające się zaburzeniami procesów spermatogenezy u karasia złocistego spowodowane przez naproksen czy feminizacją samców ryb indukowaną przez etinyloestradiał [18].

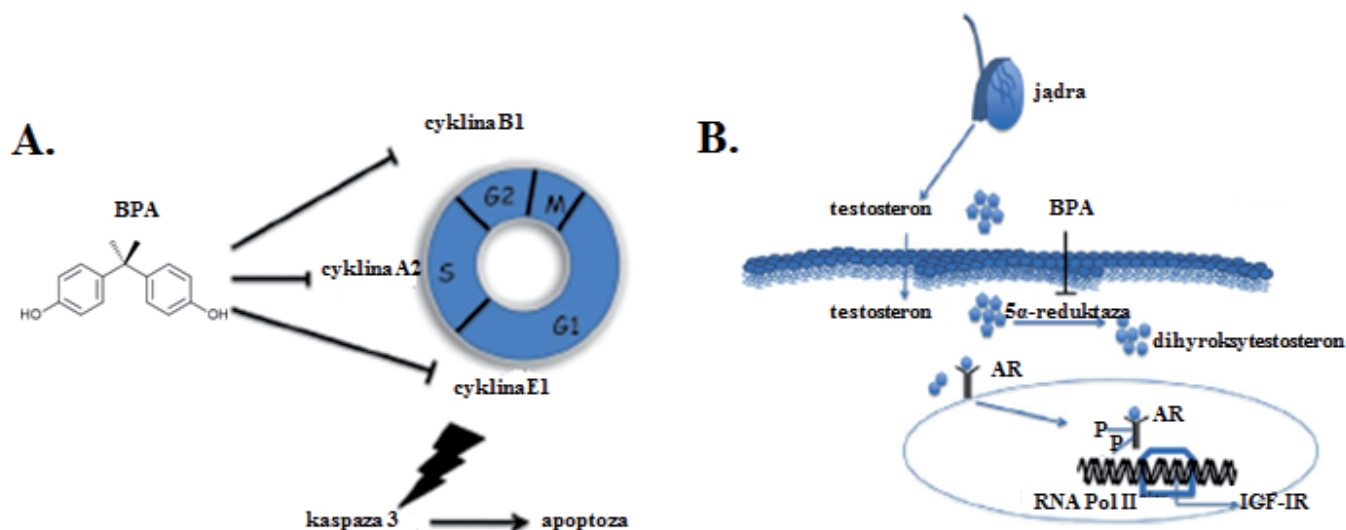
Problemem jest także rozwój lekooporności u bakterii, jako wynik obecności w środowisku antybiotyków, w stężeniu określanym jako subinhibicyjne [21]. Oznacza to, że dawka antybiotyku jest zbyt niska, aby działać bójczo na szczepy bakteryjne, ale wystarczająco duża, aby wywołać zmiany związane z odpowiedzią komórki na stres środowiskowy poprzez indukcję regulonu RpoS lub systemu SOS. Regulon RpoS związany jest z indukcją zmian na poziomie transkrypcyjnym, umożliwiającą zmianę kształtu komórki bakteryjnej, zmianę przebiegu szlaków metabolicznych czy wytwarzanie czynników wirulencji, co łącznie ma na celu adaptację do nowych, niekorzystnych warunków środowiska [22,23]. System SOS związany jest z odpowiedzią na uszkodzenia DNA zagrażające życiu komórki bakteryjnej, polegającą na zatrzymaniu replikacji, podziałów komórkowych, procesach naprawczych DNA i rekonstrukcji widełek replikacyjnych [21]. Co ciekawe, w przypadku szczepów bakterii *Escherichia coli* czy *Klebsiella pneumoniae*, system SOS zaangażowany jest w odpowiedź na działanie β -laktamów, niezależną od bezpośrednich uszkodzeń DNA. W jej wyniku dochodzi do przejściowego zatrzymania wzrostu bakterii, co uniemożliwia działanie antybiotyków, gdyż działają one jedynie w fazie podziałów komórkowych. Stosowanie subinhibicyjnych stężeń antybiotyków, wywołujących indukcję systemu SOS, sprzyja powstawaniu licznych mutacji genomu w komórkach bakterii, dzięki którym mogą lepiej adaptować się do środowiska [21]. Wytworzenie nowych cech adaptacyjnych bakterii w obecności antybiotyków jest tym bardziej niebezpieczne, że informacje zawarte w materiale genetycznym lekoopornych szczepów przekazywane są do innych komórek prokariotycznych poprzez horyzontalny transfer genów, w wyniku czego dochodzi do rozprzestrzeniania genów lekooporności [21,24]. Nie bez znaczenia jest tu również niewłaściwe lub nadmierne stosowanie antybiotyków. Choć prowadzone są programy mające na celu edukację społeczną odnośnie

stosowania antybiotyków, to jednak w latach 2010-2014 na terenie UE odnotowywano tendencję wzrostową w ich konsumpcji [25]. Z medycznego punktu widzenia, zagrożeniem płynącym z lekooporności bakterii będącej konsekwencją zwiększonej konsumpcji i obecności antybiotyków w środowisku, jest znaczne ograniczenie możliwości terapeutycznych w przypadku chorób o podłożu bakteryjnym zarówno ludzi jak i zwierząt [26-28].

Istotnym problemem, równie często poruszonym na łamach literatury naukowej, jest zagrożenie dla zdrowia wynikające z długotrwałego kontaktu z EDC. Problem jest tym większy, że z niektórymi substancjami nie sposób uniknąć kontaktu. Jednym z takich związków jest BPA, stosowany w procesie syntezy tworzyw sztucznych i obecny w wielu wyrobach jako ich zanieczyszczenie, między innymi jako zanieczyszczenie opakowań żywności, plastikowych zabawek czy artykułów dziecięcych. Dodatkowo jest on jednym ze związków EDC wykrywanych w wodzie pitnej. BPA wiążąc się z receptorami estrogenowymi może działać zarówno jako agonista jak i antagonistą w estrogenowych szlakach sygnalizacyjnych [29]. Po dostaniu się do organizmu człowieka, BPA ulega przemianom metabolicznym, polegającym przede wszystkim na jego glukuronidacji, odbywającej się w wątrobie przy udziale UDP-glukuronylotransferazy (enzym II fazy). Inne metabolity BPA mogą powstać także na drodze reakcji hydroksylowania przez enzymy I fazy metabolizmu z utworzeniem 5-hydroksybisfenolu A lub na tworzeniu pochodnej siarczanowej czy glutationowej w fazie II [17]. Wielokrotnie dokumentowano obecność niezmetabolizowanego BPA w moczu w stężeniach, które wahały się od 2,78 ng/l do nawet 4,5 µg/l, w zależności od kraju pochodzenia badanych osób. W Stanach Zjednoczonych stwierdzono obecność BPA u blisko 93% badanych [17]. BPA był także wykrywalny w osoczu krwi w stężeniu od 0,2 ng/l do 20 ng/l, a nawet we krwi pępowinowej w stężeniu do 2,6 ng/l [17,30]. Aktywność estrogenowa BPA prowadzi do zaburzeń układu rozrodczego zarówno płci żeńskiej, jak i męskiej [31]. Działanie tego

związku wiąże się między innymi z rozwojem chorób nowotworowych piersi lub jajnika. Najnowsze badania dotyczące raka jajnika wykazały, iż BPA wiążąc się z receptorem estrogenowym ER α , prowadził do uruchomienia mechanizmów zwiększających proliferację komórek nowotworowych OVCAR-3 i przyspieszających ich metabolizm, głównie procesy glikolizy [32]. BPA zaburza także prawidłowe wydzielanie takich hormonów jak gonadoliberyna (GnRH), lutropina (LH), hormon folikulotropowy (FSH). W jednym z proponowanych mechanizmów, BPA stymulując wydzielanie GnRH przez podwzgórze, powoduje wzrost wydzielania LH przez komórki gonadotropowe przysadki mózgowej i zwiększoną produkcję androgenów, prowadząc do upośledzenia rozwoju pęcherzyków i w konsekwencji do rozwoju zespołu policystycznych jajników. Zwiększenie wydzielania GnRH, LH i FSH prowadzi także do wystąpienia przedwczesnego dojrzewania [29,30]. Działanie BPA jest również przyczyną zaburzeń powodujących bezpłodność, wynikających z hamowania dwóch ważnych enzymów: aromatazy i 5 α -reduktazy. Hamowanie aromatazy, przekształcającej androgeny w estrogeny, prowadzi do obniżenia stężenia estradiolu w osoczu krwi, upośledzenia rozwoju oocytu i przebiegu owulacji u organizmów płci żeńskiej [33]. Zaburzenie w rozwoju pęcherzyków zwłaszcza na etapie fazy folikularnej, może być również wynikiem obniżonej przez BPA ekspresji cykliny E1, cykliny A2 i cykliny B1, co przekłada się na zahamowanie cyklu komórkowego pęcherzyka. Ponadto, jak wykazano w badaniach na szczurach, BPA indukuje następnie procesy apoptotyczne pęcherzyka poprzez działanie na mechanizmy zależne od kaspazy 3 (Rys. 1) [34].

U płci męskiej, 5 α -reduktaza jest enzymem odpowiedzialnym za przekształcenie testosteronu do dihydroksytestosteronu (DHT) a jej hamowanie przez BPA prowadzi do zatrzymania tej przemiany, wskutek czego nie dochodzi do utworzenia kompleksu receptora androgenowego AR z DHT [35]. Osłabia to poziom transkrypcji genów



Rysunek 1. Wpływ BPA na hamowanie cykliny B1, cykliny A2 i cykliny E1 oraz indukcję apoptozy pęcherzyka folikularnego dojrzewającego u płci żeńskiej (A) oraz mechanizm osłabienia transkrypcji genów korespondujących z receptorem AR w skutek hamowania 5 α -reduktazy u płci męskiej (B) (na podstawie [34]).

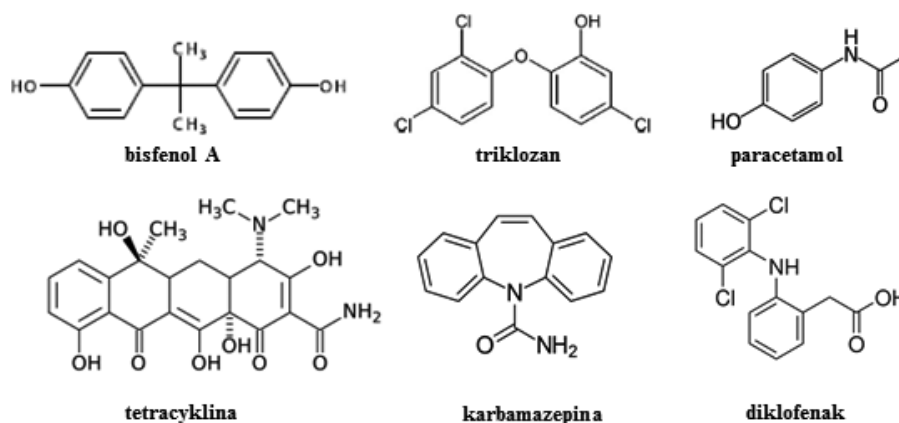
korespondujących z receptorem AR i w efekcie objawia się feminizacją zewnętrznych narządów płciowych [34].

METODY ENZYMATYCZNE DEGRADACJI ZANIECZYSZCZEŃ

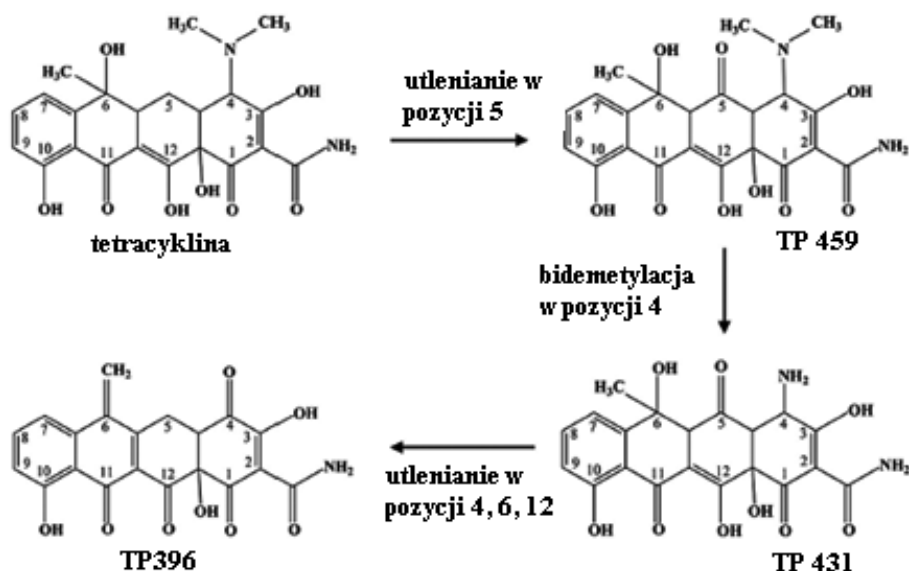
Intensywny rozwój biotechnologii pozwolił na opracowanie procesów technologicznych, opartych o działanie enzymów, które z powodzeniem zastępują tradycyjnie znane metody fizykochemiczne bardziej przyjaznymi środowisku naturalnemu procesami. Badania prowadzone na enzymach grzybowych dowiodły ich użyteczności w wielu procesach związanych z przemysłem papierniczym, tekstylnym i spożywczym, pomimo tego wciąż stanowią źródło możliwości w rozwoju innych bioprocessów, w tym związanych z bioremediacją. Od dłuższego czasu, uwaga wielu badaczy skupiona jest na zastosowaniu biokatalizatorów jako remedium na zanieczyszczenia środowiska [3,36]. Jednymi z ciekawszych badanych enzymów, są te należące do grupy cytochromów P450. Wyróżniają się zdolnością do transformacji szerokiego zakresu substratów na drodze reakcji hydroksylacji, dealkilacji, epoksydacji, redukcji i dehalogenacji, jednakże aktywność tych enzymów na potrzeby biotechnologiczne bywa często zbyt niska, co stanowi duże ograniczenie w ich stosowaniu [37]. Najczęściej opisywanymi enzymami grzybowymi o zastosowaniu biotechnologicznym są peroksydazy: manganozależna (MnP), chrzanowa (HRP) i ligninowa (LiP) oraz lakazy. Skuteczność działania tych oksydoreduktaz wielokrotnie potwierdzono w badaniach nad degradacją różnych grup zanieczyszczeń, między innymi związków fenolowych, wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych czy barwników syntetycznych o różnorodnej budowie chemicznej. Ciekawym zastosowaniem enzymów oksydoredukcyjnych, jest także konstrukcja biosensorów, które mogą pomóc w lepszym monitorowaniu środowiska pod względem obecności konkretnego rodzaju zanieczyszczenia [38]. Ze względu na obiecujące wyniki badań, wiele zespołów naukowych najczęściej stosuje enzymy oksydoredukcyjne, zwłaszcza lakazę, w pracach nad degradacją związków biologicznie czynnych. Zainteresowanie enzymem wynika z przyjaznych środowisku warunków katalizowanych reakcji, gdyż lakaza wymaga do działania jedynie obecności tlenu cząsteczkowego, w przeciwieństwie do

peroksydaz, wymagających obecności nadtlenu wodoru oraz dodatkowo jonów Mn^{2+} jak w przypadku MnP. Proste warunki reakcji w połączeniu z niską specyficznością substratową sprawiają, że zastosowanie lakazy jako katalizatora transformacji związków biologicznie aktywnych jest obiecującym rozwiązaniem [39,40]. Mimo niskiej specyficzności substratowej, budowa chemiczna degradowanej substancji jest niezwykle istotnym czynnikiem dla wydajnego przebiegu reakcji. Kluczowa jest tu obecność grup funkcyjnych, takich jak grupy aminowe, metoksylowe, hydroksylowe, sulfonowe czy karboksylowe, dzięki którym utlenianie substratu przez lakazę przebiega znacznie łatwiej. Najprostsze substraty mogą zostać utlenione w bezpośredniej reakcji z enzymem, podczas gdy związki o bardziej złożonej budowie i nieposiadające reaktywnych grup funkcyjnych, nie stanowią odpowiednich substratów dla lakazy, co wymaga w takiej sytuacji obecności tzw. mediatorów reakcji, czyli związków pośredniczących w wymianie elektronów pomiędzy lakazą a złożonym substratem (Rys. 2) [41].

Dostępne są również informacje o skuteczności działania innych oksydoreduktaz, jak na przykład peroksydazy MnP czy peroksydazy HRP, które były badane jako potencjalne biokatalizatory transformacji substancji biologicznie aktywnych. Dodatkowym atutem enzymów jest możliwość ich stosowania w formie unieruchomionej na różnego typu nośnikach, co ma na celu poprawę ich stabilności w niekorzystnych warunkach wartości pH lub temperatury oraz przy wysokim, często toksycznym dla enzymów, stężeniu substratów [42]. Ze względu na częstość występowania oraz powodowane konsekwencje zdrowotne, bisfenol A jest jednym z najczęściej badanych związków w kontekście degradacji enzymatycznej. Ze względu na obecność grup hydroksylowych w cząsteczce BPA, może być on rozpatrywany jako naturalny substrat dla lakazy i może ulegać tym samym bezpośredniemu utlenieniu. Wydajną eliminację BPA uzyskano w badaniach prowadzonych z zastosowaniem lakazy grzybowej z *Corioliopsis polyzona*, unieruchomionej na nanocząsteczkach krzemionkowych [43] oraz lakazy z *Trametes versicolor*, stosowanej w formie unieruchomionej na nanocząsteczkach, w tym na nanorurkach węglowych, w przypadku których odnotowano ponad 80% wydajność bezpośredniej degradacji BPA w porównaniu do lakazy



Rysunek 2. Struktura chemiczna przykładowych związków badanych w enzymatycznym rozkładzie przy udziale lakazy (opracowanie własne).



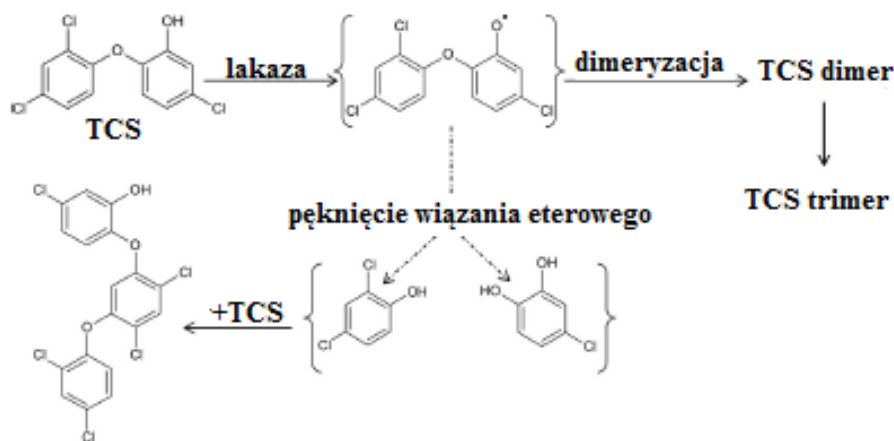
Rysunek 3. Proponowany mechanizm utleniania tetracykliny przez unieruchomioną lakazę z *Cerrena unicolor*; TP 459, TP 431; TP 396 – produkty biotransformacji tetracykliny (na podstawie [51]).

wolnej, dla której odnotowano 55% wydajność [44-46]. Mimo, iż BPA może być bezpośrednio utleniany przez lakazę, zastosowanie mediatorów reakcji może nie tylko poprawić wydajność tego procesu, ale także powodować powstanie innych produktów transformacji. Dañsi i współpracownicy, wykazali wpływ obecności HBT na proces degradacji BPA przez lakazę z *Corioliopsis gallica*. W obecności mediatora HBT oprócz przyspieszenia reakcji zaobserwowano powstawanie między innymi kwasu pirogronowego i kwasu piroglutaminowego, jako produktów pośrednich reakcji, podczas gdy przy braku HBT odnotowano powstawanie kwasu hydroksymasłowego [47]. Innymi enzymami stosowanymi w degradacji BPA były peroksydazy MnP i HRP [48]. Pomimo, że mechanizm działania lakaz i peroksydaz jest odmienny to we wszystkich biotransformacjach obserwowano pojawienie się 4-izopropenylofenolu jako produktu pośredniego przemian BPA. W jednym z modeli mechanizmów reakcji zaproponowano, iż BPA zostaje bezpośrednio utleniony przez lakazę do formy rodników fenoksylowych, które następnie tworzą dimery, trimery, a w końcu oligomery homomolekularne, połączone wiązaniami typu węgiel-węgiel lub węgiel-tlen [49].

Istotność stosowania mediatorów wykazano także w badaniach nad degradacją enzymatyczną bardziej złożonych struktur na przykładzie tetracyklin. Stosując wolną lakazę z *Phanerochaete chrysosporium* jako katalizatora reakcji, odnotowano maksymalnie 48% wydajność rozkładu tych antybiotyków, podczas gdy dla peroksydazy MnP z *T. versicolor* w 4-krotnie krótszym czasie uzyskano od 84% do 100% degradacji w zależności od badanej tetracykliny. Najlepsze wyniki uzyskano w reakcji prowadzonej przez lakazę w obecności mediatora (HBT), dzięki czemu możliwy był bardzo wydajny, całkowity rozkład wszystkich badanych form tetracykliny w czasie maksymalnie 60 minut [50]. Antybiotyki z tej grupy badano także z zastosowaniem lakazy z *Cerrena unicolor*, unieruchomionej

w postaci nierozpuszczalnych agregatów (CLEA, ang. *cross-linked enzyme aggregates*). Wynikiem doświadczenia było całkowite usunięcie tetracykliny (TC) (stężenie 100 µg/ml) w ciągu 48 godzin, przy czym ponad 80% degradacji związku odnotowano w pierwszych 12 godzinach reakcji [51]. Analizując skład mieszaniny reakcyjnej pod względem liczby i budowy powstających produktów z zastosowaniem techniki LC-TOF MS (ang. *Liquid Chromatography Time of Flight Mass Spectrometry*) zaproponowano trój etapowy przebieg procesu [51] (Rys. 3).

Rozkład TC, oksytetracykliny (OTC) i chlorotetracykliny badany był także w środowisku osadów rzecznych zawierających dodatek antybiotyków o znanym stężeniu (100 mg/kg osadu). Reakcję prowadzono w bioreaktorach w obecności wolnej i kapsułkowanej w alginianie lakazy z *Pleurotus eryngii*. Wyniki doświadczenia wskazały, że badane związki z osadów zostały usunięte w 97% przez lakazę wolną i w 99% przez formę unieruchomioną. Autorzy pracy zaznaczają, że otrzymane wyniki mogą być spowodowane nie tylko działaniem lakazy, ale także biodegradacją tetracykliny przez obecne w osadach mikroorganizmy [52]. Związkiem wyjątkowo trudnym do degradacji przy użyciu lakazy grzybowej jest karbamazepina (CBZ), w przypadku której stosowanie mediatora reakcji jest absolutnie konieczne. Potwierdzono to w badaniach degradacji CBZ przez lakazę z *T. versicolor*. Stosowanie mediatora w postaci kwasu *p*-kumarowego podniosło wydajność reakcji z 5% (bez mediatora) do ponad 30%. Jeszcze większą wydajność uzyskano stosując lakazę unieruchomioną, dzięki której wydajność procesu wzrosła do 60% [53]. Wyniki przedstawionych prac wskazują na zwiększoną wydajność procesu degradacji przy użyciu lakazy w formie unieruchomionej. Pomimo, iż naukowcy zwracają uwagę na możliwość częściowej adsorpcji związku na stosowanym nośniku, to jednak nie bez znaczenia jest większa stabilność lakazy, spowodowana jej unieruchomieniem tak jak w przypadku enzy-



Rysunek 4. Proponowane szlaki transformacji triklozanu z udziałem lakazy z *T. versicolor* i *Phoma* sp. W wyniku utlenienia TCS dochodzi do utworzenia formy rodnikowej ulegającej dimeryzacji lub pęknięcia wiązania eterowego i sprzęgania 2,4-dichlorofenolu z TCS (na podstawie [54]).

matycznego rozkładu triklozanu (TCS) przez lakazę z *T. versicolor* unieruchomioną na chitozanie [42]. Zaobserwowano 100% rozkład TCS przez unieruchomiony biokatalizator w ciągu 6 h w porównaniu do lakazy wolnej, dla której uzyskano jedynie 60% wydajność procesu. Pomiarzy aktywności obu lakaz po zakończonym procesie wykazały 45% spadek aktywności lakazy wolnej i brak zmian aktywności lakazy unieruchomionej, co przełożyło się na większą wydajność procesu degradacji. Jednocześnie prowadzono także prace nad ustaleniem mechanizmu tego procesu. Wskutek działania lakazy dochodzi do pęknięcia wiązania eterowego w cząsteczce triklozanu i utworzenia 2,4-dichlorofenolu (2,4-DCP), który następnie ulega oligomeryzacji z uwolnieniem chloru [42]. Podobne wnioski wyciągnęli Jahangiri i współpracownicy, testujący jako katalizator wolną lakazę z *T. versicolor* oraz *Phoma* sp., którzy stwierdzili możliwość wystąpienia dwóch szlaków enzymatycznej transformacji triklozanu. Pierwszym z nich było wspomniane pęknięcie wiązania eterowego z utworzeniem cząsteczki monochlorokatecholu i 2,4-dichlorofenolu, który ulegał następnie sprzęganiu z pozostałymi cząsteczkami TCS. Szlak ten stanowił jednak mniejszy procent całej reakcji. Znacznie większy udział w transformacji TCS miała natomiast dimeryzacja form rodnikowych TCS powstających z bezpośredniego utlenienia związku przez lakazę. Mimo takiego samego mechanizmu transformacji, jej wydajność różniła się w zależności od lakazy i wynosiła 53% dla lakazy z *T. versicolor* i 41% dla lakazy z *Phoma* sp. (Rys. 4) [54].

Oksydoreduktazy grzybowe badano także pod kątem degradacji niesteroidowych leków przeciwwzapalnych, takich jak DCF, który był wydajnie rozkładany zarówno przez unieruchomione lakazy (*Pleurotus florida* oraz *T. versicolor*), jak i peroksydazę LiP z *P. chrysosporium* [55-57]. W badaniach prowadzonych z użyciem peroksydazy HRP zidentyfikowano produkt reakcji transformacji DCF, którym był diklofenako-2,5-iminochinon [58]. Rozkład pozostałych związków z grupy NLPZ, β -blokerów, fibratów czy środków psychotropowych badano między innymi z zastosowaniem unieruchomionej rekombinowanej lakazy z *Aspergillus oryzae*, działającej w obecności

aldehydu syringowego a wydajność procesu dla wszystkich związków nie była mniejsza niż 60% [40]. Ciekawym rozwiązaniem było także zastosowanie kilku enzymów oksydoredukcyjnych takich jak lakazy, peroksydazy hybrydowej (VP), i oksydazy glukozy (GO), unieruchomionych razem w postaci nierozpuszczalnych agregatów. Badania były prowadzone przez Touahar i współpracowników [59], w kierunku rozkładu mieszaniny zanieczyszczeń, w skład których wchodziły wymienione wcześniej związku biologicznie aktywne. Uzyskane wyniki wskazały na skuteczność działania unieruchomionych enzymów głównie wobec naproksenu, kwasu mefenamowego, diklofenaku, indometacyny i paracetamolu. Ten ostatni związek, obecny w próbkach ścieków, był rozkładany przez agregaty wspomnianych enzymów z 25% skutecznością [59]. Paracetamol poddano również transformacji z użyciem agregatów złożonych z lakazy i tyrozynazy, którymi działano na próbki ścieków komunalnych oraz szpitalnych usuwając odpowiednio do 100% i do 90% paracetamolu [60].

Mimo wydajnej degradacji zanieczyszczeń na drodze biokatalizy, metabolity powstające podczas tych procesów mogą być równie aktywne biologicznie a nawet być bardziej toksyczne niż substancje wyjściowe [61]. W związku z tym, niemal nieodłącznym elementem badań nad degradacją związków aktywnych biologicznie są testy toksyczności produktów otrzymanych w wyniku reakcji transformacji. W ocenie toksyczności wody stosuje się wiele testów z użyciem organizmów żywych, od bakterii i grzybów, przez glony oraz rośliny, po drobne bezkręgowce i ryby [19]. Najczęściej jednak, do podstawowej oceny toksyczności badanej substancji stosuje się metody oparte o hamowanie metabolizmu i wzrostu różnych szczepów bakteryjnych. Jedną z najpopularniejszych metod, jest test toksyczności środowiskowej z zastosowaniem bakterii luminescencyjnych *Vibrio fischeri*. Zdolność do bioluminescencji wynika z obecności w ich komórkach enzymu lucyferazy, utleniającej tlenem cząsteczkowym nukleotyd FMNH₂ i alifatyczny aldehyd długołańcuchowy do nietrwałego kompleksu, emitującego fotony podczas rozpadu. Im większa jest toksyczność badanej sub-

stancji, tym bardziej metabolizm bakterii zostaje zakłócony, co przekłada się na spadek intensywności świecenia [19,62]. Dodatkowymi metodami są także badania hamowania wzrostu mikroorganizmów przez badane substancje, a w niektórych przypadkach także analizy aktywności estrogennej. W teście bioluminescencji wykazano między innymi niską toksyczność produktów powstałych po transformacjach pirimidonu, karbamazepiny oraz ibuprofenu przez lakazę z *A. oryzae*, zwracając jednocześnie uwagę na problem zwiększonej toksyczności próbek tych związków, degradowanych w obecności mediatorów [63]. Mimo, iż mediatory reakcji są nieodzownym elementem w enzymatycznych reakcjach degradacji mikrozanieczyszczeń katalizowanych przez lakazę, ich utlenienie wiąże się z produkcją reaktywnych rodników, które oprócz udziału w tworzeniu metabolitów, negatywnie oddziałują także na inne biocząsteczki wywołując efekt toksyczny [63]. Stąd też, podczas opracowania metodyki rozkładu zanieczyszczeń z udziałem mediatorów, należy wziąć pod uwagę dobrze ich odpowiedniego stężenia, aby zapewnić możliwie najbardziej wydajny przebieg reakcji z jednoczesnym ograniczeniem toksyczności. Jedną z takich propozycji przedstawili Nguyen i współpracownicy [40] w badaniach nad degradacją różnego rodzaju mikrozanieczyszczeń w obecności aldehydu syryngowego (SA). Wykazali oni zależności między obecnością SA podczas reakcji degradacji a zwiększeniem stopnia toksyczności mieszanin po reakcji. Ponadto zaproponowali, iż w przypadku rozkładu mikrozanieczyszczeń w stężeniu 50 µg/l, stężenie SA nie powinno przekraczać 10 µM, ponieważ dalsze zwiększenie stężenia SA przekładało się tylko na wzrost toksyczności otrzymanych produktów [40]. Podobne obserwacje udokumentowano także w badaniach nad degradacją różnych grup antybiotyków w obecności 10 µM i 100 µM SA [61]. Skuteczność enzymatycznej degradacji zanieczyszczeń bez udziału mediatora, wykazano natomiast w badaniach TCS, którego metabolity otrzymane po 72-godzinnej reakcji przy udziale lakazy z *Phoma* sp., powodowały jedynie 11% zahamowanie wzrostu bakterii *Escherichia coli* K12 [54]. Szczep ten stosowano także w badaniach toksyczności metabolitów powstałych w degradacji TC i OTC, na podstawie których wykazano skuteczność w obniżaniu aktywności tych antybiotyków. Poddając bakterie działaniu metabolitów otrzymanych po 48 godzinach reakcji, uzyskano 6% i 7% zahamowanie wzrostu *E. coli* odpowiednio przez TC i OTC. Dodatkowe testy przy zastosowaniu mikroorganizmów bardziej wrażliwych na działanie antybiotyków, jakimi są bakterie z rodzaju *Bacillus* wykazały nieznacznie większy stopień hamowania wzrostu w obecności tetracykliny i oksytetracykliny, odpowiednio 8% i 7% [51]. W niektórych badaniach są stosowane obie metody – hamowania bioluminescencji i hamowania wzrostu mikroorganizmów, w celu dokładniejszej oceny toksyczności otrzymanych produktów. W badaniach dotyczących rozkładu hormonów, oprócz standardowych testów toksyczności prowadzi się także testy aktywności estrogennej produktów degradacji. Dzięki takim testom, Spina i współpracownicy [64] wykazali nie tylko efektywność w usuwaniu, ale i detoksyfikacji wielu zanieczyszczeń, w

tym 17β-estradiolu, którego produkty uzyskane w procesie biokatalizy nie wykazały aktywności estrogennej [64].

PODSUMOWANIE

Zaburzenie równowagi ekosystemów, rozwój chorób związanych z nieprawidłowym działaniem układu endokrynnego i lekooporność mikroorganizmów sprawiają, że zanieczyszczenia związkami biologicznie aktywnymi są obecnie realnym zagrożeniem dla wielu organizmów żywych, w tym także człowieka. W związku z niewystarczającą wydajnością degradacji tych zanieczyszczeń standardowymi metodami fizykochemicznymi, skutecznym rozwiązaniem może okazać się zastosowanie biokatalizy z udziałem niskospecyficznego enzymu oksydoredukcyjnego otrzymanego z grzybów ligninolitycznych, głównie lakazy grzybowej. Skala prowadzonych badań oraz skuteczność testowanych metod dają szansę na opracowanie procesów pozwalających na eliminację związków biologicznie aktywnych, a tym samym ochronę zarówno otaczającego środowiska jak i człowieka.

PIŚMIENNICTWO

1. Czech B (2012) Usuwanie farmaceutyków z wód i ścieków z wykorzystaniem metod adsorpcyjnych i fotokatalitycznych. W: Ryczkowski J (red) Nauka dla Gospodarki. Adsorbenty i Katalizatory. Wybrane Technologie a Środowisko, Uniwersytet Rzeszowski, Rzeszów, str. 443-452
2. Czerwiński J, Klonica A, Ozonek J (2015) Pozostałości farmaceutyków w środowisku wodnym i metody ich usuwania. JCEEA 62: 27-42
3. Alcade M, Ferrer M, Plou FJ, Ballesteros A (2006) Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes. TRENDS Biotechnol, 24: 281-287
4. Kot-Wasik A, Dębska J, Namieśnik J (2003) Przemiany, stężenia i onaczanie pozostałości środków farmaceutycznych w środowisku. W: Namieśnik J, Chrzanowski W, Szpinek P (red) Nowe Horyzonty i Wyzwania w Analityce i Monitoringu, Centrum Doskonałości Analityki i Monitoringu Środowiskowego (CEEAM), Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, Gdańsk, str. 722-744
5. Boroń M, Pawlas K (2015) Farmaceutyki w środowisku wodnym – przegląd literatury. PHiE, 96: 357-363
6. Fedejko B, Mazerska Z (2011) UDP-glukuronylotransferazy, białka siateczki śródplazmatycznej - struktura i mechanizm działania. Post Bioch 57: 41-48
7. Szymonik A, Lach A (2013) Pharmaceuticals in surface and drinking water. Proceedings of ECOpole 7: 23-26
8. Zuccato E, Castiglioni S, Bagnati R, Melis M, Fanelli R (2010) Source, occurrence and fate of antibiotics in the Italian aquatic environment. J Hazard Mater 179: 1042-1048
9. Watkinson AJ, Murby EJ, Costanzo SD (2007) Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: Implications for environmental discharge and wastewater recycling. Water Res 41: 4164-4176
10. Conley JM, Symes SJ, Schorr MS, Richards SM (2008) Spatial and temporal analysis of pharmaceutical concentrations in the upper Tennessee River basin. Chemosphere 73: 1178-1187
11. Tamtam F, Mercier F, Le B, Eurin J, Tuc Q, Clément M, Cedex P (2007) Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions. Sci Total Environ 393: 84-95
12. Andreu V, Gimeno-García E, Pascual JA, Vazquez-Roig P, Picó Y (2016) Presence of pharmaceuticals and heavy metals in the waters of a Mediterranean coastal wetland: Potential interactions and the influence of the environment. Sci Total Environ 540: 278-286
13. Mompelat S, Le Bot B, Thomas O (2009) Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. Environ Int 35: 803-814

14. Valcárcel Y, Alonso SG, Rodríguez-Gil JL, Maroto RR, Gil A, Catalá M (2011) Analysis of the presence of cardiovascular and analgesic/anti-inflammatory/antipyretic pharmaceuticals in river- and drinking-water of the Madrid Region in Spain. *Chemosphere* 82: 1062-1071
15. Lacina P, Mravcov L, Milada V (2013) Application of comprehensive two-dimensional gas chromatography with mass spectrometric detection for the analysis of selected drug residues in wastewater and surface water. *J Environ Sci* 25: 204-212
16. Pluciennik-Koropczuk E (2014) Non-steroid anti-inflammatory drugs in municipal wastewater and surface waters. *CEER* 14: 63-74
17. Michałowicz J (2014) Bisphenol A – Sources, toxicity and biotransformation. *Environ Toxicol Phar* 37: 738-758
18. Szymonik A, Lach J (2012) Zagrożenie środowiska wodnego obecnością środków farmaceutycznych. *Inż i Ochr Środ* 15: 249-263
19. Traczewska TM (2011) Biologiczne metody oceny skażenia środowiska. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław
20. Näslund J, Fick J, Asker N, Ekman E, Larsson DGJ, Norrgren L (2017) Diclofenac affects kidney histology in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) at low µg/L concentrations. *Aquat Toxicol* 189: 87-96
21. Zabłotni A, Jaworski A (2014) Źródła antybiotyków w środowiskach naturalnych i ich rola biologiczna. *Post Hig* 6: 1040-1049
22. Dąbrowska G, Prusińska J, Goc A (2005) Odpowiedź ścisła - mechanizm adaptacyjnej odpowiedzi bakterii na warunki stresowe. *Post Bioch* 52: 87-93
23. Chiang SM, Schellhorn HE (2010) Evolution of the RpoS regulon: Origin of RpoS and the conservation of RpoS-dependent regulation in bacteria. *J Mol Evol*, 70: 557-571
24. Kasprzykowska U, Sobieszczarska BM (2014) Plastyczność bakteryjnych genomów – międzykomórkowy transfer informacji genetycznej. *Post Mikrob* 53, 165-171
25. Raport Europejskiego Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób, Stockholm 2015
26. Kowalczyk P, Jankiewicz U (2013) Metody przenoszenia informacji genetycznej i ich wpływ na zdrowie człowieka. *Nowa Med* 2: 124-129
27. Hollis A, Ahmed Z (2014) The path of least resistance: Paying for antibiotics in non-human uses. *Health Policy* 118: 264-270
28. Courvalin P (2016) Why is antibiotic resistance a deadly emerging disease? *Clin Microbiol Infec* 22: 405-407
29. Konieczna A, Rutkowska A, Rachoń D (2015) Health risk of exposure to bisfenol A (BPA). *Rocz Państ Zakł Hig* 66: 5-11
30. Rogala D, Kulik-Kupka K, Śniezek E, Janicka A, Moskalenko O (2016) Bisfenol A – niebezpieczny związek ukryty w tworzywach sztucznych. *PHiE* 97: 213-219
31. Szymańska JA, Frydryh B (2006) 2,2-Bis(4-hydroksyfenilo)-propan - pyły. Dokumentacja dopuszczalnych wielkości narażenia zawodowego. Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy 3: 101-117
32. Shi XY, Wang Z, Liu L, Feng LM, Li N, Liu S, Gao H (2017) Low concentrations of bisphenol A promote human ovarian cancer cell proliferation and glycolysis-based metabolism through the estrogen receptor-α pathway. *Chemosphere* 185: 361-367
33. Baravalle R, Ciarabella A, Baj F, Di Nardo G, Gilardi G (2017) Identification of endocrine disrupting chemicals acting on human aromatase. *BBA-Proteins Proteom*, <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.05.013>
34. Sifakis S, Androutsopoulos VP, Tsatsakis AM, Spandidos DA (2017) Human exposure to endocrine disrupting chemicals: effects on the male and female reproductive systems. *Environ Toxicol Phar* 51: 56-70
35. Kula K, Słowikowska-Hilczler J (2003) Biologiczny charakter identyfikacji, roli i psychoorientacji płciowej. *Kosmos* 258: 11-19
36. Burton SG (2003) Oxidizing enzymes as biocatalysts. *TRENDS in Biotechnol* 21: 543-549
37. van der Brick HJM, van Gorcom RFM, van den Hondel CAMJJ, Punt P J (1998) Cytochrome P450 enzyme systems in fungi. *Fungal Genet Biol* 23: 1-17
38. Rao MA, Scelza R, Acevedo F, Diez MC, Gianfreda L (2014) Enzymes as useful tools for environmental purposes. *Chemosphere* 107: 145-162
39. Rivera-Hoyos CM, Morales-Álvarez ED, Poutou-Piñales RA, Pedrosa-Rodríguez AM, Rodríguez-Vázquez R, Delgado-Boada JM (2013) Fungal laccases. *Fungal Biol Rev* 27: 67-82
40. Nguyen LN, Merwe JP, van De Hai FJ, Leusch FDL, Kang J, Price WE, Roddick F, Magram SF, Nghiem LD (2016) Laccase – syringaldehyde-mediated degradation of trace organic contaminants in an enzymatic membrane reactor: Removal efficiency and effluent toxicity. *Bioresour Technol* 200: 477-484
41. Polak J, Jarosz-Wilkolazka A (2007) Reakcje katalizowane przez lakazę – mechanizm i zastosowanie w biotechnologii. *Biotechnologia* 4: 82-94
42. Cabana H, Ahamed A, Leduc R (2011) Conjugation of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor* to chitosan and its utilization for the elimination of triclosan. *Bioresour Technol* 102: 1656-1662
43. Galliker P, Hommes G, Schlosser D, Corvini PFX, Shahgaldian P (2010) Laccase-modified silica nanoparticles efficiently catalyze the transformation of phenolic compounds. *J Colloid Interf Sci* 349, 98-105
44. Pang R, Li M, Zhang C (2015) Degradation of phenolic compounds by laccase immobilized on carbon nanomaterials: diffusional limitation investigation. *Talanta*, 131: 38-45
45. Dai Y, Yao J, Song Y, Liu X, Wang S, Yuan Y (2016) Enhanced performance of immobilized laccase in electrospun fibrous membranes by carbon nanotubes modification and its application for bisphenol A removal from water. *J Hazard Mater* 317: 485-493
46. Lin J, Liu Y, Chen S, Le X, Zhou X, Zhao Z, Ou Y, Yang J (2016) Reversible immobilization of laccase onto metal-ion-chelated magnetic microspheres for bisphenol A removal. *Int J Biol Macromol* 84: 189-199
47. Daäsi D, Prieto A, Zouari-Mechichi H, Martínez MJ, Nasri M, Mechichi T (2016) Degradation of bisphenol A by different fungal laccases and identification of its degradation products. *Int Biodeter Biodegr* 110: 181-188
48. Hautphenne C, Pennickx M, Debaste F (2016) Product formation from phenolic compounds removal by laccases: A review. *Environ Technol Innov* 5: 250-266
49. Tsutsumi Y, Haneda T, Nishida (2001) Removal of estrogenic activities of bisphenol A and nonylphenol by oxidative enzymes from lignin-degrading basidiomycetes. *Chemosphere* 42: 271-257
50. Suda T, Hata T, Kawai S, Okamura H, Nishida T (2012) Treatment of tetracycline antibiotics by laccase in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. *Bioresour Technol* 103: 498-501
51. Yang J, Lin Y, Yang X, Bun T, Ye X, Lin J (2017) Degradation of tetracycline by immobilized laccase and the proposed transformation pathway. *J Hazard Mater* 322: 525-531
52. Chang BV, Ren YL (2015) Biodegradation of three tetracyclines in river sediment. *Ecol Eng* 75: 272-277
53. Ji C, Hou J, Wang K, Zhang Y, Chen V (2016) Biocatalytic degradation of carbamazepine with immobilized laccase-mediator membrane hybrid reactor. *J Membrane Sci* 502: 11-20
54. Jahangiri E, Seiwert B, Reemtsma T, Schlosser D (2017) Laccase- and electrochemically mediated conversion of triclosan: Metabolite formation and influence on antibacterial activity. *Chemosphere* 168: 549-558
55. Zhang Y, Geißen SU (2010) In vitro degradation of carbamazepine and diclofenac by crude lignin peroxidase. *J Hazard Mater* 176: 1089-1092
56. Sathishkumar P, Chae JC, Unnithan AR, Palvannan T, Kim HY, Lee KJ, Cho M, Kamala-Kannan S, Oh BT (2012) Laccase-poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanofiber: highly stable, reusable, and efficacious for the transformation of diclofenac. *Enzyme Microb Tech* 51: 113-118
57. Xu R, Tang R, Zhou Q, Li F, Zhang B (2015) Enhancement of catalytic activity of immobilized laccase for diclofenac biodegradation by carbon nanotubes. *Chem Eng J* 262: 88-95
58. Huber C, Preis M, Harvey PJ, Gross S, Letzel T, Schröder P (2016) Emerging pollutants and plants - Metabolic activation of diclofenac by peroxidases. *Chemosphere* 146: 435-441
59. Touahar IE, Haroune L, Ba S, Bellenger J, Cabana H (2014) Characterization of combined cross-linked enzyme aggregates from laccase, versatile peroxidase and glucose oxidase, and their utilization for the elimination of pharmaceuticals. *Sci Total Environ* 481: 90-99

60. Ba S, Haroune L, Cruz-Morató C, Jacquet C, Touahar IE, Bellenger J, Legaut CY, Jones P, Cabana H (2014) Synthesis and characterization of combined cross-linked laccase and tyrosinase aggregates transforming acetaminophen as a model phenolic compound in wastewaters. *Sci Total Environ* 487: 748-755
61. Becker D, Varela S, Rodriguez-Mozaz S, Schoevaart R, Barceló D, de Cazes M, Marie-Pierre B, Sanchez-Marcano J, de Gunzburg J, Couille-rot O, Völker J, Oehlmann J, Wagner M (2016) Removal of antibiotics in wastewater by enzymatic treatment with fungal laccase – degradation of compounds does not always eliminate toxicity. *Bioresource Technol* 219: 500-509
62. Kuczyńska A, Wolska L, Namieśnik J (2003) Zastosowanie biotestów w badaniach środowiskowych. W: Namieśnik J, Chrzanowski W, Szpinek P (red) *Nowe Horyzonty i Wyzwania w Analityce i Monitoringu CEEAM*, Gdańsk, str. 668-699
63. Asif MB, Hai FI, Kang J, Merwe JP, Van De Leusch FDL, Price WE, Nghiem LD (2018) Biocatalytic degradation of pharmaceuticals, personal care products, industrial chemicals, steroid hormones and pesticides in a membrane distillation-enzymatic bioreactor. *Bioresource Technol* 247: 528-536
64. Spina F, Cordero C, Schilirò T, Sgorbini B, Pignata C, Gilli G, Bicchi C, Varese GC (2015) Removal of micropollutants by fungal laccases in model solution and municipal wastewater: evaluation of estrogenic activity and ecotoxicity. *J Clean Prod* 100: 185-194

Biologically active compounds and methods of their removal through biocatalysis

Kamila Wlizło ✉, Jolanta Polak, Anna Jarosz-Wilkołazka

Faculty of Biology and Biotechnology, Maria Curie-Skłodowska University, Lublin, Poland

✉ e-mail: kamila.wlizlo@poczta.umcs.lublin.pl

Key words: biocatalysis, micropollutants, endocrine disruptor compounds

Acknowledgments: This work was partially supported by National Science Centre within Prelude 9 (2015/17/N/NZ9/03647) and Sonata 11 (2016/21/D/NZ9/02460) projects.

ABSTRACT

Pharmaceuticals and other biologically active substances are produced in increasing numbers. Because of increased usage and improper storage, they pass into surface water, ground water and drinking water directly or through wastewaters. This is a threat to many living organisms, including humans, because of hormonal imbalances primarily related to reproductive processes or the problem of microbial drug resistance. Due to the scale of the emission and limited possibilities of decomposition of these pollutants by physico-chemical methods it is necessary to develop new efficient processes. One of the proposed solutions is the use of tools offered by biocatalysis. Thanks to the biocatalysis process, a wide range of biologically active compounds can be removed, by using of enzymes with low substrate specificity and operating in environmentally friendly conditions. Recent studies indicate the effectiveness of those methods used in the removal of pollutants of different chemical structure, with the formation of non-toxic metabolites.