

Mirosława Słaba*, Natalia Wrońska*, Aleksandra Felczak*,
Jerzy Długoński*

ZASTOSOWANIE GRZYBA STRZĘPKOWEGO *PAECILOMYCES MARQUANDII* DO JEDNOCZESNEJ ELIMINACJI CYNKU I ZWIĄZKÓW CYNOORGANICZNYCH

APPLICATION OF THE FILAMENTOUS FUNGUS *PAECILOMYCES MARQUANDII* FOR SIMULTANEOUS ZINC AND ORGANOTIN COMPOUNDS ELIMINATION

Słowa kluczowe: metale ciężkie, wiązanie cynku, związki cynoorganiczne, dibutylocyna, dioktylocyna, trioktylocyna, *Paecilomyces marquandii*.

Key words: heavy metals, zinc uptake, organotin compounds, dibutyltin, dioctyltin, trioctyltin, *Paecilomyces marquandii*.

The ability of Paecilomyces marquandii IM 6003 to grow in the presence of zinc and organotin compounds, and to eliminate these xenobiotics was tested. It was shown that dibutyltin ((DBT) was more toxic to this fungus than dioctyltin (DOT), trioctyltin (TOT) and zinc. During the incubation in rich Sabouraud medium, zinc ions content in the mycelium reaches 10–20 mg per g of dry weight and was increased up to 70 – 80 mg per g by DBT. Additionally, the influence of this metal on the degradation of organotin compounds was measured. P. marquandii can remove up to 90, 60 and 28 % of TOT, DOT and DBT present in media if their initial concentrations are 100, 75 and 10 mg·l⁻¹, respectively. The TOT removal is significantly faster than DOT and DBT decrease. It was also established that the elimination of DOT in the zinc presence is strongly limited, whereas TOT depletion is not inhibited by zinc (10 mM). The study of organotins removal with autoclaved mycelium revealed that dead biomass can bind trioctyltin well (60–70%).

The obtained results indicate the potential application of P. marquandii for zinc uptake in the presence of organotin compounds and TOT elimination in zinc presence.

* Dr Mirosława Słaba, mgr Natalia Wrońska, dr Aleksandra Felczak, prof. Jerzy Długoński – Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; kontakt: tel.: + 48 (42) 6354465; fax: +48 (42) 6784932; e-mail: jdlugo@biol.uni.lodz.pl

1. WPROWADZENIE

Związki cynoorganiczne (OTC) są zaliczane do ksenobiotyków, syntetyzowanych chemicznie w dużych ilościach i emitowanych do środowiska naturalnego przez różne gałęzie przemysłu. Obecnie znanych jest około 800 tych związków, z tego większość pochodzenia antropogenicznego. Szacuje się, że 70 % syntetyzowanych substancji cynoorganicznych jest wykorzystywane w produkcji PCV, pianek poliuretanowych i silikonów, 20 % stosuje się w otrzymywaniu biocydów, a pozostałą ilość w syntezach chemicznych (jako katalizatory) [Hoch 2001]. Związki metaloorganiczne są wykrywane przede wszystkim w wodach, osadach i organizmach wodnych [Suzuki i in. 1996; Lespes i in. 2005; Murata i in. 2008]. Niektóre z nich, np. tributylocynę (TBT), charakteryzuje bardzo duża toksyczność w odniesieniu do ludzi i zwierząt [Gadd 2000; Hoch 2001; Bernat i Długoński 2006].

Źródłem dibutylocyny (DBT) w środowisku jest zarówno chemiczna synteza, jak i degradacja TBT (dealkilacja). Dibutylocyna jest mniej toksyczną pochodną TBT, ale również wykazuje właściwości biocydu.

Dioktylocyna (DOT) i trioktylocyna (TOT) znajdują liczne zastosowania w przemyśle chemicznym, głównie w produkcji tworzyw syntetycznych oraz w przemyśle farmaceutycznym.

Oktylocyny początkowo uważane były za substancje bezpieczne. Wykazano jednak, że oktylowane związki cyny (DOT) działają toksycznie na układ immunologiczny [Kishi i in. 2006]. Fagi i in. [2001] udowodnili, że stabilizator ZK 30.434, używany w produkcji tworzyw PCV i zawierający DOT (80%) oraz MOT (20%), wywołuje anomalie szkieletowe i rozszczep podniebienia u płodów zwierząt laboratoryjnych.

Użyty w prezentowanej pracy szczep grzyba strzępkowego *Paecilomyces marquandii* IM 6003 pochodzi ze środowiska silnie skażonego metalami ciężkimi z obszaru Śląska i jak wykazały wcześniejsze badania, jest zdolny do wzrostu w obecności wysokich stężeń metali ciężkich oraz efektywnego wiązania cynku i ołowiu [Słaba i Długoński 2004; Słaba i in. 2005]. Może też być wykorzystywany do jednoczesnej eliminacji alachloru i cynku [Słaba i in. 2009].

W środowisku naturalnym często dochodzi do kumulacji zanieczyszczeń organicznych i nieorganicznych. Według Agencji Ochrony Środowiska (EPA, USA) 40% niebezpiecznych odpadów zawiera jednocześnie organiczne polutanty oraz zanieczyszczenia metalami ciężkim, co stanowi szczególnie duże zagrożenie dla zdrowia zwierząt i ludzi [Hoffman i in. 2005]. Metalem ciężkim, uwalnianym w największej ilości do środowiska naturalnego, głównie w wyniku aktywności przemysłowej człowieka, jest cynk [Klimiuk i Łebkowska 2003]. Emisja tego metalu w Polsce w roku 2006 wynosiła według GUS ponad 1300 ton [Rocznik statystyczny... 2008].

Celem pracy była próba zastosowania mikroskopowego grzyba *P. marquandii* do jednoczesnej eliminacji substancji cynoorganicznych i związków cynku.

2. MATERIAŁY I METODY

Drobnoustroje. Obiektem badań był *Paecilomyces marquandii* IM 6003, mikroskopowy grzyb strzępkowy pochodzący z kolekcji szczepów Katedry Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii Uniwersytetu Łódzkiego.

Odczynniki. Związki cynoorganiczne dodawane do hodowli były zakupione w Aldrich (DBT), LGC Standards (DOT i TOT), Supelco (tetrabutyllocyna – wzorzec wewnętrzny) i octan cynku w firmie Sigmia. Rozpuszczalniki organiczne, kwasy mineralne oraz inne używane odczynniki pochodziły z firm: Sigma, Fluka, Baker i POCH.

Hodowle *P. marquandii* w obecności związków cynoorganicznych i cynku. Zarodniki, pochodzące z 10-dniowych hodowli na skosach ZT [g/l: glukoza, 4; ekstrakt drożdżowy Difco, 4; agar, 25; brzeczka 6° BLG, do 1 l, pH 7,0], zmywano podłożem Sabouraud [zawierającym w g/l: peptonu 10; glukozy 40, wody dejonizowanej do 1 l, oraz o pH 5,8–6,0]. Sączono przez jałowy lejek z watą szklaną w celu usunięcia resztek grzybni. Zawiesinę zarodników o gęstości 5×10^7 /ml inkubowano przez 24 godziny w temp. 28°C, w kolbach stożkowych o objętości 100 ml, na wytrząsarce obrotowej (180 obr/min.). Następnie homogeną grzybnię pasażowano do nowej porcji podłoża (15% inokulum) i inkubowano kolejne 24 godziny. Do kolb stożkowych z podłożem Sabouraud dodawano związki cynoorganiczne (stężone roztwory w 96% etanolu) oraz inokulum. Wprowadzano jałowy roztwór octanu cynku (stężony roztwór wodny) do hodowli, zawierających cynk lub jednocześnie cynk i związek cynoorganiczny, przed wprowadzeniem inokulum. Jednocześnie zakładano kontrole biotyczne, zawierające podłoże i inokulum oraz kontrole abiotyczne z podłożem i ksenobiotykiem lub podłożem, ksenobiotykiem i metalem. Hodowle prowadzono w wyżej opisanych warunkach .

Po inkubacji biomasę sączono przez sączki, przepłukiwano dwa razy wodą dejonizowaną, suszono do stałej masy i wyznaczano suchą masę grzybni w g/l. Próby zawierające związki cynoorganiczne homogenizowano z dodatkiem acetonu i stężonego kwasu solnego (pH 2–3). Takie warunki umożliwiały skuteczną ekstrakcję związków cynoorganicznych. Ekstrakcję, derywatyzację i przygotowanie prób do analizy chromatograficznej wykonywano według metody opisanej przez Bernata i Długońskiego [2006].

W celu określenia przydatności martwej grzybni do usuwania oktylocyn 48-godzinne hodowle grzyba sączono przez bibułowe sączki, przepłukiwano i zawieszano w wodzie dejonizowanej, a następnie autoklawowano przez 20 minut w 117°C. Martwą hodowlę sączono przez bibułowe sączki, przepłukiwano wodą dejonizowaną i zawieszano w podłożu Sabouraud z dodatkiem TOT i DOT. Próby inkubowano analogicznie jak kultury z żywą grzybnią.

Analiza zawartości związków cynoorganicznych w hodowli. Oznaczenie ilościowe związków cynoorganicznych prowadzono przy użyciu chromatografu gazowego Hewlett-Packard 6890, sprzężonego z detektorem masowym HP 5973, na kolumnie kapilarnej HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). W analizie oktylocyn temperatura kolumny wynosiła 80°C przez 1 min, po czym była zwiększana do wartości 290°C, w tempie 20°C/min. W przypadku DBT temperatura kolumny wynosiła 60°C przez 4,5 min, następnie wzrastała do 280°C w ciągu 20 min. Jako gaz nośny wykorzystywano hel, przy stałym jego przepływie 1,2 ml/min.

Określenie zawartości cynku w grzybni. Porcje grzybni pochodzące z hodowli prowadzonej w obecności octanu cynku sączono przez sączki Synpor o średnicy porów 0,6 μm , przepłukiwano 2 razy wodą dejonizowaną. Suszono do stałej masy w temp. 105°C. Wysuszoną i zważoną biomasę mineralizowano w piecu termicznym, używając mieszaniny stężonych kwasów azotowego i nadchlorowego (w stosunku objętościowym 4:1). Analizę ilościową zawartości metalu prowadzono na spektrometrze Varian 300 (Spectra). Zawartość cynku w grzybni określano w mg/g suchej masy. Szczegóły analizy przedstawiono we wcześniejszych pracach [Słaba i Długoński 2004; Słaba i in. 2005].

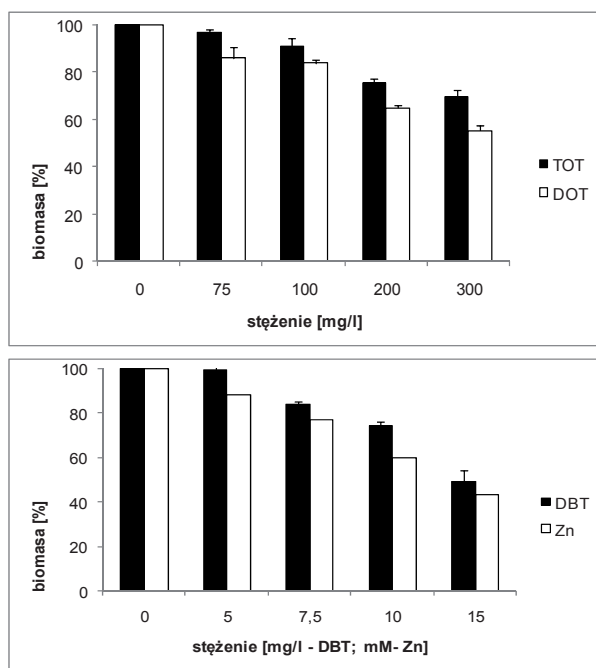
Wszystkie próby wykonano w trzech powtórzeniach. Uzyskane wyniki, prezentowane w całej pracy, są średnią z trzech powtórzeń \pm SD.

3. WYNIKI I DISKUSJA

W początkowym etapie badań oceniono zdolność do wzrostu grzyba *P. marquandii* w hodowlach na bogatym podłożu, w obecności różnych stężeń trioktylocyniny, dioktylocyniny, dibutylocyniny oraz octanu cynku, o różnych stężeniach (rys. 1).

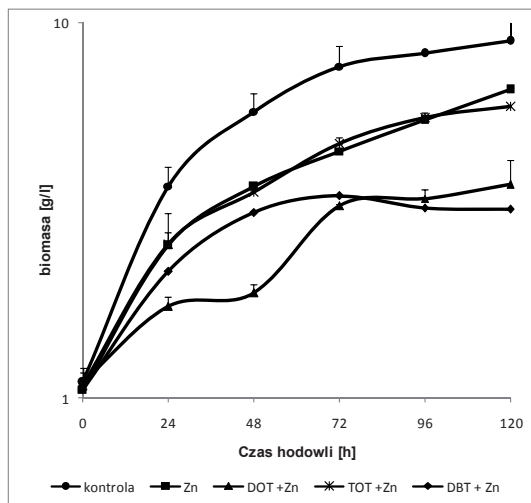
Przyrost biomasy wyrażono w %. Punktem odniesienia był wzrost grzyba w hodowlach kontrolnych, bez dodatku ksenobiotyków i cynku (wartość równa 100%). Na podstawie wyników przedstawionych na rysunku 1 można stwierdzić, że badany szczep był zdolny do wzrostu w obecności wszystkich trzech związków cynoorganicznych oraz cynku, w badanym zakresie stężeń. Przyrost biomasy był najsilnie ograniczony przez DBT. Wzrost w hodowlach zawierających 15 mg/l biocydu był zahamowany w ponad 50 procentach. Najmniej toksycznym związkiem cyny dla badanego szczepu był TOT. W hodowlach z dodatkiem trioktylocyniny, wynoszącym 300 mg/l, ilość biomasy była tylko o 30 % niższa niż w układzie kontrolnym.

Uzyskane wyniki były zbieżne z wynikami, które dokumentują wyższą toksyczność DOT i MOT niż TOT [Faqi i in. 2001; Kishi i in. 2006]. Cynk powodował ograniczenie wzrostu grzyba, przy czym stopień zahamowania był proporcjonalny do stężenia jonów metalu, np. 10 mM o około 40%. Do dalszych badań nad jednoczesnym działaniem związków cynoorganicznych i cynku wybrano stężenia: 10 mg/l dla DBT, 100 mg/l dla TOT i DOT oraz 10 mM Zn^{2+} (rys. 2).



Rys. 1. Przyrost biomasy *P. marquandii* na podłożu Sabouraud po 48 h hodowli z dodatkiem różnych stężeń związków cynoorganicznych i jonów cynku

Fig. 1. *P. marquandii* biomass after 48 h of cultures on Sabouraud medium supplemented with different concentrations of organotin compounds and zinc ions

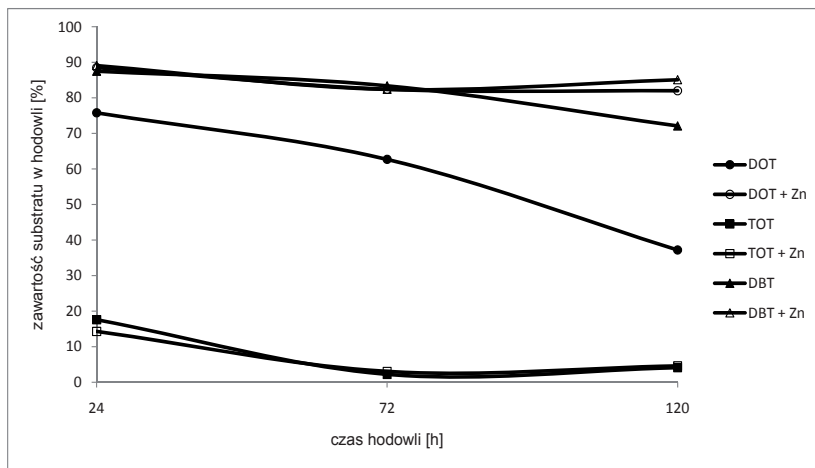


Rys. 2. Krzywe wzrostu hodowli *P. marquandii* poddanych skojarzonemu działaniu ksenobiotyków i jonów cynku

Fig. 2. Growth curves of *P. marquandii* cultures upon simultaneous effect of xenobiotics and zinc ions

Wzrost szczepu w obecności trioktylocyny i cynku był porównywalny do krzywej wzrostu prowadzonej w obecności samego cynku (rys. 2). Jednoczesne działanie DBT lub DOT z cynkiem skutkowało znaczącym ograniczeniem wzrostu szczepu o ponad 50% w porównaniu do hodowli kontrolnych.

Następnie określono zdolność badanego szczepu do usuwania ksenobiotyków w obecności jonów cynku w środowisku wzrostu – w stężeniu 10 mM (rys. 3).



Rys. 3. Eliminacja organicznych związków cyny przez *P. marquandii* w obecności jonów cynku

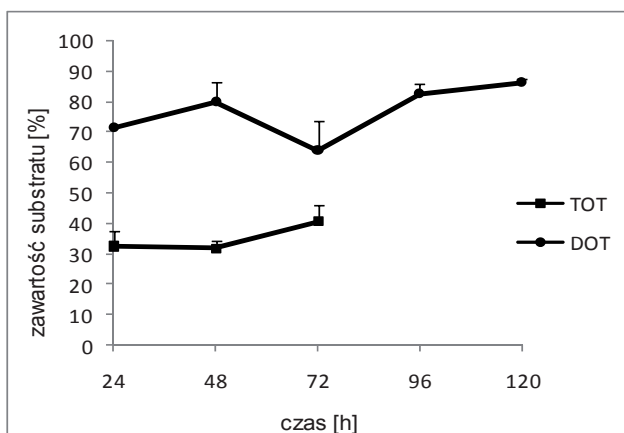
Fig. 3. Organotins elimination by *P. marquandii* in the presence of zinc ions

Za punkt odniesienia przyjęto zawartość ksenobiotyków oznaczoną w kontrolach abiotycznych, zawierających podłoże i ksenobiotyk (wartość odpowiadającą 100%). Najbardziej toksyczny z badanych związków cyny – DBT – był usuwany z prowadzonych hodowli do 28% i tylko bez obecności cynku. Maksymalny ubytek dioktylocyny – dodawanej do podłoża w ilości 75 mg/l – wynosił 70% i miał miejsce tylko w układzie bez metalu. Najszybciej i najefektywniej była usuwana trioktylocyna. Już po 24 godzinach zawartość TOT zmniejszyła się do około 20%. Po 72 godzinach hodowli pozostała w niej śladowa ilość tego związku. Co ciekawe, eliminacja tego ksenobiotyku zachodziła efektywnie również przy wysokim stężeniu jonów cynku w hodowlach (10 mM). Eliminacja OTC ze środowiska może przebiegać na drodze biodegradacji lub biosorpcji [White i in. 1999; Gadd 2000; Hoch 2001]. Pomimo dużej toksyczności związków metaloorganicznych niektóre drobnoustroje, np. bakterie *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, glony *Chlorella*, grzyby strzępkowe *Cunninghamella*, są zdolne do degradacji organocyn, polegającej na odłączaniu grup organicznych od atomu cyny [Tsang i in. 1999; Gadd 2000; Bernat i Długoński 2006; Luan i in. 2006]. Bernat i Długoński udowodnili [2002], że biodegradacja TBT przez *Cunninghamella* jest zależna od aktywności układu enzy-

matycznego, zawierającego cytochrom P-450. Z kolei biosorpcja organocyn jest uwarunkowana występowaniem tych związków w postaci kationów, wiążących się z ujemnie naładowanymi grupami funkcyjnymi, obecnymi na powierzchni komórek [White i in. 1999; Gadd 2000].

Obserwowane różnice w usuwaniu DOT i TOT przez *P. marquandii*, w obecności cynku (rys. 3), mogą świadczyć o eliminacji TOT na drodze biernej sorpcji, w eliminację DOT natomiast mogły być zaangażowane enzymy wrażliwe na toksyczne metale. Wiązanie DOT i TOT przez autoklawowaną grzybnię przedstawiono na rysunku 4. Wcześniejsze doświadczenia (rys.3) ujawniły, że ubytek DOT zachodził wolniej niż TOT, dlatego analizę zawartości DOT w badanych układach przedłużono do 120 godziny inkubacji.

W martwej grzybni uległo związaniu od 60 do 70% dodanego do podłoża TOT, podczas gdy w tych samych warunkach DOT było usunięte w ilości od 13 do 35%. Potwierdza to wcześniejsze przeprowadzenie, że bierna sorpcja miała największe znaczenie w eliminacji TOT, a usuwanie DOT było w większym stopniu zależne od aktywności metabolicznej grzyba. Negatywny wpływ metali ciężkich na układy enzymatyczne, zaangażowane w biodegradację zarówno naturalnie występujących związków organicznych, jak i ksenobiotyków, jest dobrze udokumentowany [Amor i in. 2001; Sandrin i Maier 2003; Wong i in. 2005].

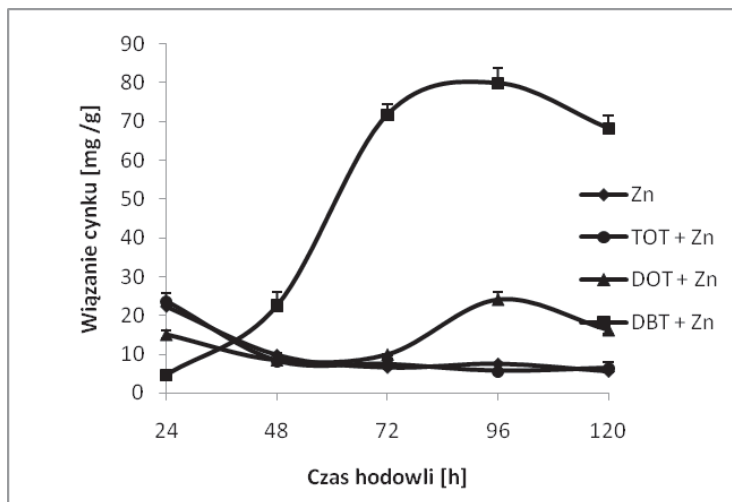


Rys. 4. Usuwanie DOT i TOT przez martwą grzybnię *P. marquandii*

Fig. 4. DOT and TOT removal by dead mycelium of *P. marquandii*

W celu sprawdzenia przydatności szczepu do jednoczesnej eliminacji związków cyanoorganicznych i cynku określono również efektywność wiązania metalu przez grzybnię w czasie hodowli na podłożu z dodatkiem organicznych związków cyny (rys. 5).

W układzie kontrolnym zawierającym tylko metal wiązanie przebiegało na niskim poziomie, wynoszącym około 10 mg/g s.m. (rys.5).



Rys. 5. Wiązanie cynku przez grzybnię w obecności TOT, DOT i DBT

Fig. 5. Zinc uptake by mycelium in the presence of TOT, DOT and DBT

W układzie skojarzonym, zawierającym oprócz metalu również TOT, akumulacja cynku była na zbliżonym poziomie. Jednak w obecności DOT zawartość cynku w grzybni zwiększała się dwukrotnie od 96 godziny hodowli. W hodowlach zawierających jednocześnie metal i DBT, zaobserwowano, że w fazie stacjonarnej hodowli znacząco wzrastał pobór jonów cynku do grzybni, osiągając wartość do 80 mg Zn²⁺/g s.m. Stymulację wiązania cynku w grzybni *P. marquandii* pochodzącej z fazy stacjonarnej uzyskano również w hodowlach prowadzonych przy jednoczesnej obecności cynku i alachloru – herbicydu powszechnie stosowanego w rolnictwie [Słaba i in. 2009]. Podobnie jak w prezentowanej pracy, stwierdzono, że wzrost wiązania metalu w grzybni jest skorelowany ze wzrostem toksyczności na skutek jednoczesnego działania metalu i ksenobiotyku.

4. PODSUMOWANIE

Uzyskane w pracy wyniki wskazują na możliwość zastosowania grzybni *P. marquandii* zarówno do usuwania cynku w obecności toksycznych związków cynoorganicznych, jak i do efektywnej eliminacji trioktylocyny ze środowisk zanieczyszczonych jednocześnie cynkiem.

Prezentowana praca była finansowana w ramach grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w Polsce oraz Ministerstwa Edukacji i Nauki w Hiszpanii (Nr 31/HIS/2007/02).

PIŚMIENNICTWO

- AMOR L., KENNES C., VEIGA M.C. 2001. Kinetics inhibition in the biodegradation of monoaromatic hydrocarbons in the presence of heavy metals. *Bioresource Technology* 78: 181–185.
- BERNAT P., DŁUGOŃSKI J. 2002. Degradation of tributyltin by the filamentous fungus *Cunninghamella elegans*, with involvement of cytochrome P-450. *Biotechnology Letters*. 24: 1971–1974.
- BERNAT P., DŁUGOŃSKI J. 2006. Acceleration of tributyltin chloride (TBT) degradation in liquid cultures of the filamentous fungus *Cunninghamella elegans*. *Chemosphere* 62: 3–8.
- FAQI A.S., SCHWEINFURTH H., CHAHOUD I. Developmental toxicity of an octyltin stabilizer in NMRI mice. *Reproductive Toxicology* 15: 117–122.
- GADD G.M. 2000. Microbial interaction with tributyltin compounds: detoxification, accumulation, and environmental fate. *The Science of the Total Environment* 258: 119–127.
- HOCH M. 2001. Organotin compounds in the environment – an overview. *Applied Geochemistry* 16: 719–743.
- HOFFMAN D.R., OKON J.L., SANDRIN T.R. 2005. Medium composition affects the degree and pattern of cadmium inhibition of naphthalene biodegradation. *Chemosphere* 59: 919–927.
- KISHI H., NEMOTO M., ENOMOTO M., SHINODA M., KAWANOBE T., MATSUI H. 2006. Acute toxic effects of dioctyltin on immune system of rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 22: 240–247.
- KLIMIUK E., ŁEBKOWSKA M. 2003. *Biotechnologia w ochronie środowiska*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- LESPE G., BANCON-MONTIGNY C., AGUERRE S., POTIN-GAUTIER M. 2005. Organotin speciation in waters and sediments in the Adour-Garonne basin. *Journal of Water Science* 18: 47–63.
- LUAN T.G., JIN J., CHAN S.M.N., WONG Y.S., TAM N.F.Y. 2006. Biosorption and Biodegradation of tributyltin (TBT) by alginate immobilized *Chlorella vulgaris* beads in several treatment cycles. *Process Biochemistry* 41: 1560–1565.
- MURATA S., TAKAHASHI S., AGUSA T., THOMAS N.J., KANNAN K., TANABE S. 2008. Contamination status and accumulation profiles of organotins in sea otters (*Enhydra lutris*) found dead along the coasts of California, Washington, Alaska (USA), and Kamchatka (Russia). *Marine Pollutant Bulletin* 56: 641–649.
- Rocznik Statystyczny Rzeczypospolitej Polskiej**. 2008. Red. gł.: Dmochowska H. Zakład Wydawnictw Statystycznych, Warszawa.
- SANDRINT.R., MAIER R.M. 2003. Impact of metals on the biodegradation of organic pollutants. *Environmental Health Perspectives* 111: 1093–1101.
- SŁABA M., BIZUKOJC M., PAŁECZ B., DŁUGOŃSKI J. 2005. Kinetic study of the toxicity of zinc and lead ions to the heavy metals accumulating fungus *Paecilomyces marquandii*. *Bioprocess and Biosystem Engineering* 28: 185–197.

- SŁABA M., DŁUGOŃSKI J. 2004. Zinc and lead uptake by mycelium and regenerating protoplasts of *Verticillium marquandii*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 20: 323–328.
- SŁABA M., SZEWCZYK R., BERNAT P., DŁUGOŃSKI J. 2009. Simultaneous toxic action of zinc and alachlor resulted in enhancement of zinc uptake by the filamentous fungus *Paecilomyces marquandii*. *Science of the Total Environment* 407: 4127–4133.
- SUZUKI T., YAMADA H., YAMAMOTO I., NISHIMURA K., KONDO K., MURAYAMA M., UCHIYAMA M. 1996. Chemical species of organotin compounds in seawater and their seasonal variations. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 44: 3989–3995.
- TSANG C.K., LAU P.S., TAM N.F., WONG Y.S. 1999. Biodegradation capacity of tributyltin by two *Chlorella* species. *Environmental Pollutants* 105: 289–297.
- WHITE J.S., TOBIN J.M., COONEY J.J. 1999. Organotin compounds and their interactions with microorganisms. *Canadian Journal of Microbiology* 45: 541–554.
- WONG K.W., TOH B.A., TING Y.P., OBBARD J.P. 2005. Biodegradation of phenanthrene by the indigenous microbial biomass in a zinc amended soil. *Letters in Applied Microbiology* 40: 50–55.