

Katarzyna Zawadzka

Mikrobiologiczna degradacja wybranych związków N-heterocyklicznych o działaniu farmakologicznym

N-heterocykliczne węglowodory aromatyczne powszechnie wykorzystywane do syntezy barwników, pestycydów czy leków są często wykrywane w środowisku naturalnym. Związki te wykazują wysoką toksyczność wobec organizmów wodnych, a ich przemiany środowiskowe są wciąż słabo poznane. Konwencjonalne oczyszczalnie ścieków nie są przystosowane do skutecznej eliminacji tej grupy zanieczyszczeń, dlatego stanowią źródło ich emisji do wód powierzchniowych. Ze względu na ciągle uwalnianie tych związków do ekosystemów wodnych oraz ich niską biodegradowalność mogą one egzystować w środowisku przez wiele lat, dlatego poszukiwane są wydajne metody ich eliminacji. Coraz większym zainteresowaniem cieszą się procesy biotechnologiczne wykorzystujące mikroorganizmy do degradacji ksenobiotyków. Najpowszechniej wykrywanym w próbach środowiskowych, a zarazem jednym z najbardziej toksycznych trójpierścieniowych związków N-heterocyklicznych jest karbazol. Proces bakteryjnej degradacji karbazolu został szczegółowo opisany w dostępnej literaturze, niewiele jednak wiadomo na temat jego metabolizmu przez grzyby strzępkowe. Brak jest również danych na temat mikrobiologicznej degradacji jego farmakologicznie aktywnych pochodnych.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było wyselekcjonowanie drobnoustrojów zdolnych do efektywnej eliminacji karbazolu i jego farmakologicznie aktywnej pochodnej – karwedilolu, wyjaśnienie szlaków mikrobiologicznej degradacji tych związków oraz mechanizmów ich rozkładu. Proces mikrobiologicznej degradacji karbazolu i karwedilolu badano z wykorzystaniem technik chromatografii gazowej oraz cieczowej sprzężonych ze spektrometrią mas (GC-MS i LC-MS/MS).

Wyniki skryningu mikroskopowych grzybów strzępkowych w kierunku ich zdolności do degradacji karbazolu pozwoliły na wyselekcjonowanie szczepów o wysokim potencjale degradacyjnym należących do rodzaju *Cunninghamella*, które eliminowały do 90% początkowego stężenia karbazolu (200 mg/L). Wykazano, że proces biotransformacji karbazolu przez grzyby *Cunninghamella* przebiega na drodze reakcji hydroksylacji. Ocena toksyczności płynów pochodzących z badanych drobnoustrojów inkubowanych z dodatkiem karbazolu nie wykazała wzrostu toksyczności powstających metabolitów. Odnotowano ponadto zmiany profilu fosfolipidowego grzybów *Cunninghamella* w odpowiedzi na toksyczne działanie karbazolu.

W kolejnym etapie realizacji pracy oceniono zdolność do degradacji karwedilolu przez grzyby strzępkowe wstępnie zaklasyfikowane jako drobnoustroje efektywnie eliminujące karbazol. Ponownie, najwyższym potencjałem degradacyjnym charakteryzowały się szczepy z rodzaju *Cunninghamella* które eliminowały do 80% ksenobiotyku. Stwierdzono, że metabolizm tego farmaceutyku przez szczepy *Cunninghamella* przebiega głównie na drodze reakcji hydroksylacji, metylacji, demetylacji oraz sprzęgania z różnymi molekułami i wykazuje podobieństwo do metabolizmu karwedilolu w organizmach ssaków. Potwierdzono również, że cytochrom P450 oraz reduktaza cytochromu P450 są zaangażowane w proces biotransformacji karwedilolu przez *C. elegans* IM 1785/21Gp. Wykazano ponadto, że biodegradacja tego farmaceutyku przez szczep *C. echinulata* IM 2611 prowadzi do jego detoksykacji.

Oceniono również zdolność degradacji karwedilolu przez wybrane bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne. Wykazano, że bakterie Gram-ujemne, które są bardziej odporne na działanie karwedilolu, są zdolne do jego degradacji rozkładając strukturę związku w obrębie łańcucha łączącego pierścienie karbazyłowy i fenyłowy. Stwierdzono również, że karwedilolu wykazuje silne działanie przeciwdrobnoustrojowe wobec bakterii Gram-dodatnich, a główną tarczą jego działania są osłony komórkowe.

Do chwili obecnej zagadnienia dotyczące mikrobiologicznej degradacji karwedilolu nie były przedmiotem badań. W pracy tej po raz pierwszy wykazano, że grzyby strzępkowe z rodzaju *Cunninghamella* są zdolne do biotransformacji karbazolu i jego farmakologicznie aktywnej pochodnej – karwedilolu. Podjęte prace umożliwiają pozyskanie szczepów zdolnych do wydajnej eliminacji karbazolu oraz jego farmakologicznie aktywnych pochodnych. Z drugiej zaś strony, poznanie szlaków mikrobiologicznej degradacji badanych związków może pozwolić na pogłębienie wiedzy na temat ich możliwych przemian w środowisku zachodzących pod wpływem drobnoustrojów.

Katarzyna Lwadek

Katarzyna Zawadzka
**Microbial degradation of the chosen N-heterocyclic compounds with
pharmacological activity**

N-heterocyclic aromatic hydrocarbons commonly used for the synthesis of dyes, pesticides or drugs are frequently detected environmental pollutants. These compounds are characterized by a relatively high level of toxicity to aquatic organisms and their environmental fate is still poorly understood. Conventional sewage treatment plants are not adapted to effectively eliminate this type of pollutants from sewage, therefore they are a source of the emission of toxic compounds to the environment. The continuous emission of these compounds to aquatic ecosystems and their low biodegradability cause that they can exist in the environment for many years. For this reason efficient methods of their elimination are being developed. Biotechnological processes using microorganisms to degrade xenobiotics are very popular. Carbazole is the most commonly detected and the most toxic tricyclic N-heterocyclic compound. The process of its bacterial degradation has been described in detail in the available literature, but little is known about its metabolism by filamentous fungi. There is also no data on the microbial degradation of its pharmacologically active derivatives.

The subject of this doctoral thesis was to select microorganisms capable of effectively eliminating carbazole and its pharmacologically active derivative - carvedilol, explaining microbial pathways and mechanisms of their degradation. The microbial degradation process was examined using gas and liquid chromatography techniques coupled with mass spectrometry (GC-MS and LC-MS/MS).

Results from screening of microscopic filamentous fungi in terms of their ability to degrade carbazole allowed selecting the strains with a high degradation potential belonging to the *Cunninghamella* species, which eliminated up to 90% of the initial carbazole concentration (200 mg/L). It was shown that the fungi *Cunninghamella* transformed carbazole via hydroxylation reactions. The assessment of toxicity of fungal cultures extracts did not show an increase in the toxicity of the carbazole metabolites produced by tested fungi. There were changes in the membrane phospholipid profile of the fungi after their incubation with the addition of carbazole, which could be their response to the toxic effects of xenobiotics.

In the next stage of the work, carvedilol degradation capacity was assessed by filamentous fungi initially classified as microorganisms capable of effectively eliminating carbazole. Again, the fungi *Cunninghamella* showed the highest degradation potential. *C.*

echinulata IM 2611 eliminated up to 80% of the initial carvedilol concentration (20 mg/L). It was found that the metabolism of carvedilol occurs mainly via hydroxylation, methylation, demethylation and conjugation reactions and its fungal metabolism is similar to the metabolism of the β -blocker in mammalian organisms. It was also shown that cytochrome P450 and cytochrome P450 reductase are involved in the biotransformation of carvedilol by *C. elegans* IM 1785/21Gp. In addition, it was found that the biodegradation of carvedilol by *C. echinulata* IM 2611 leads to its detoxification.

The ability to degrade carvedilol by selected Gram-positive and Gram-negative bacteria was also assessed. It was shown that Gram-negative bacteria, which are more resistant to carvedilol, are able to degrade it by breaking down the structure of the compound within the chain linking the carbazolyl and phenyl rings. It was also found that carvedilol possesses a high antimicrobial activity against Gram-positive bacteria, and the main target of its action is the bacterial cell envelope.

The issues regarding the microbial degradation of carvedilol have not been studied so far. In this work for the first time it was shown that filamentous fungi of the *Cunninghamella* species are able to biotransform carbazole and its pharmacologically active derivative - carvedilol. The conducted research makes it possible to obtain strains capable of efficiently eliminating carbazole and its pharmacologically active derivatives. On the other hand, understanding the microbial pathways of degradation of the tested compounds may allow extending the knowledge about their potential fate in the environment.

Katarzyna Ławandowska