

WYKORZYSTANIE KONSTRUKTU GENOWEGO *KATG::LUX* DO MONITORINGU CYTOTOKSYCZNOŚCI I GENOTOKSYCZNOŚCI METOPROLOLU W ŚRODOWISKU

Eliza Hawrylik¹, Marzena Matejczyk¹

¹ Zakład Biologii Sanitarnej i Biotechnologii, Politechnika Białostocka, ul. Wiejska 45E, 15-351 Białystok, e-mail: e.hawrylik@doktoranci.pb.edu.pl

STRESZCZENIE

Celem niniejszej pracy była ocena możliwości wykorzystania mikrobiologicznego biosensora *Escherichia coli* z konstruktem genowym *katG::lux* w badaniach monitorujących cytotoksyczność i genotoksyczność metoprololu w środowisku. Organizmem modelowym w przeprowadzonej ocenie był szczep *Escherichia coli* K-12 RFM 443 zawierający konstrukt genowy *katG::lux*, natomiast analizowanym farmaceutykiem był metoprolol – powszechnie stosowany w leczeniu ludzi lek kardiologiczny należący do grupy β – blokerów. Lek stosowano w stężeniach od 10^{-1} mg/cm³ do 10^{-5} mg/cm³. Badania wykazały, że metoprolol w stosowanych stężeniach zmieniał poziom ekspresji genu *lux* i wpływał na aktywność promotora *katG*. Otrzymane wyniki świadczą o możliwości potencjalnego zastosowania biosensora bakteryjnego *Escherichia coli* K-12 RFM 443 z fuzją genową *katG::lux* w monitoringu cytotoksyczności i genotoksyczności pozostałości metoprololu w środowisku.

Słowa kluczowe: biosensory bakteryjne, gen reporterowy *lux*, metoprolol, cytotoksyczność, genotoksyczność

APPLICATION OF *KATG::LUX* GENE CONSTRUCT FOR CYTOTOXICITY AND GENOTOXICITY MONITORING OF METOPROLOL IN ENVIRONMENT

ABSTRACT

The aim of the study was the evaluation of usefulness of *Escherichia coli* K-12 RFM 443 *katG::lux* for cytotoxicity and genotoxicity monitoring of metoprolol in the environment. Metoprolol is one of the most popular cardiac drug which belongs to the group of β – blockers. The drug was applied at concentrations ranging from 10^{-1} mg/cm³ to 10^{-5} mg/cm³. Obtained data indicated the influence of metoprolol on *lux* gene expression and *katG* promoter activity in *E.coli* K-12. The results indicated the possibility of using of *Escherichia coli* K-12 RFM 443 strain with *katG::lux* gene construct in the monitoring of cytotoxicity and genotoxicity cardiac drug residues in the environment.

Keywords: bacterial biosensors, reporter gene *lux*, metoprolol, cytotoxicity, genotoxicity

WPROWADZENIE

Corocznie, na potrzeby medycyny oraz weterynarii produkuje się, a następnie zużywa tysiące ton leków. Ich bardzo duża część trafia do wód powierzchniowych w formie praktycznie niezmięnionej. Ze względu na swoje właściwości pozostałości farmaceutyczne nie ulegają samostnej degradacji podczas procesów samooczyszczania się wód, a ponadto mają zdolność do akumulacji w tkankach organizmów wyższych.

Czynniki te wpływają na fakt bezpośredniego zagrożenia zdrowia i życia organizmów mających z nimi styczność [Rzepa 2009].

Istnieje wiele dróg przedostawania się farmaceutyków do środowiska. Ich podstawowym źródłem są metabolity wydalane z moczem z ludzkiego organizmu, przedostające się do ścieków komunalnych. Biotransformacja leków nie zachodzi w 100%, w związku z czym z moczem wydalana jest zarówno postać zmetabolizowana, jak i wolna [Janiec 2005]. Na coraz szerszą

skalę odnotowuje się również odprowadzanie do oczyszczalni ścieków pozostałości z przemysłu farmaceutycznego, gdzie do procesów produkcji zużywa się ogromne ilości środków chemicznych [Guchelaar i in. 1999]. Jednym z głównych źródeł tego rodzaju zanieczyszczeń wciąż są także ścieki szpitalne oraz ścieki pochodzące z gospodarstw domowych (często zdarzają się sytuacje spłukiwania przeterminowanych leków w spłuczkiach toaletowych). Oprócz szpitali i gospodarstw domowych do środowiska leki trafiają ze stacji diagnostycznych, a nawet ferm hodowlanych [Felis i in. 2005]. Problemem są również odpady medyczne oraz niewykorzystane farmaceutyki trafiające na składowiska odpadów [Sosnowska i in. 2009].

Coraz większy wskaźnik występowania pozostałości farmaceutycznych w środowisku związany jest z niewystarczającą skutecznością procesu utylizacji leków. Obecnie stosowane technologie oczyszczania ścieków nie są niestety ukierunkowane na usuwanie tego rodzaju zanieczyszczeń [Szymonik i Lach 2012]. Ponadto metabolity leków wydalane z kałem oraz moczem cechują się coraz częściej odpornością na procesy biodegradacyjne, co istotnie zmniejsza efektywność oczyszczania ścieków pod tym kątem [Kot – Wasik i in. 2003]. Sprawność procesu oczyszczania dla każdej substancji leczniczej jest inna. W największym stopniu oczyszczają się farmaceutyki należące do niesteroidowych leków przeciwzapalnych: ibuprofen (37–59%), ketoprofen (72–86%) i naproksen (86–89%), zaś najslabszy efekt oczyszczania uzyskiwany jest w przypadku β -bloкера – atenololu (4–47%) [Szymonik i Lach 2012].

Jak wynika z dotychczas przeprowadzonych badań i analiz najczęściej wykrywanymi farmaceutykami w środowisku są: niesteroidowe leki przeciwzapalne (naproksen, kwas acetylosalicylowy, diklofenak, ibuprofen, ketoprofen); antybiotyki (erytromycyna, trimetoprim, sulfametozazol); leki regulujące gospodarkę lipidową (kwas kłofibrowy, bezafibrat); hormony (estron (E1), estradiol (E2), etinyloestradiol (EE2)); leki psychotropowe (karbamazepina, fluoksetyna) oraz β – blokery (metoprolol, atenolol, propranolol) [Nikolaou i in. 2007, Szymonik i Lach 2012].

Wzrastająca zachorowalność na choroby układu sercowo-naczyniowego, które według danych GUS powodują w Polsce blisko połowę zgonów [Cierniak – Piotrowska i in. 2015], potęguje zużycie leków kardiologicznych, co jest równoznaczne z wysokim ryzykiem występowania

pozostałości tych farmaceutyków w środowisku. β – blokery wykrywane są w środowisku wodnym różnych krajów. W wodach powierzchniowych Polski metoprolol występuje na poziomie 0.05–0.15 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$, zaś w Hiszpanii osiąga poziom 0.04 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ [Czech 2012, Valcarcel i in. 2011]. W Wielkiej Brytanii propranolol wykrywany jest w stężeniu od 0.005 do 0.007 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$, natomiast w wodach powierzchniowych Walii jego koncentracja waha się w granicach 0.009–0.4 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ [Czech 2012, Kasprzyk – Hordern i in. 2009]. Pomimo, iż stężenia tych leków nie są wysokie, mają jednak one zdolność trwałej kumulacji w organizmach żywych i stanowią realne zagrożenie dla prawidłowego funkcjonowania ekosystemu wodnego.

Do oszacowania stopnia zanieczyszczenia środowiska lekami kardiologicznymi oraz do oceny ryzyka ekotoksykologicznego z pełnym powodzeniem wykorzystywane mogą być biosensory mikrobiologiczne.

Mikrobiologiczne biosensory bakteryjne są połączeniem materiału biologicznego z materiałem przetwornikowym (systemem mikroelektronicznym). Biosensor to „urządzenie”, które umożliwia szybkie i dokładne wykrywanie niskiego poziomu różnych substancji w płynach ustrojowych, wodzie, glebie oraz powietrzu [Belkin 2003]. Działanie czujników biologicznych oparte jest o system specyficznych interakcji pomiędzy enzymami i ich substratami, o wzajemne rozpoznawanie przeciwciał i antygenów, polega również na dostępności specyficznych molekuł dla ich receptorów lub na wysokim powinowactwie kwasów nukleinowych do ich sekwencji komplementarnych. Komponentem biologicznym biosensorów może być: enzym, przeciwciało, DNA, receptor, cały mikroorganizm, bądź kolonia bakteryjna [Matejczyk 2010]. Dobór odpowiedniego składnika biologicznego w biosensorze zapewnia jego należytą funkcjonalność. Uzależniony jest on przede wszystkim od operacyjnej i środowiskowej stabilności, a także rodzaju substancji podlegającej analizie [D’Souza 2001]. Podczas wyboru promotora szczególną uwagę należy zwrócić na jego czułość oraz specyficzność. Niektóre promotory bakteryjne są w stanie wykryć stężenie związku chemicznego rzędu ppb (ang. parts per billion) lub nawet jego opary. W stosunku do specyficzności, należy pamiętać o tym, że promotory najczęściej reagują na grupy związków (np. metale ciężkie), rzadziej na konkretny składnik zanieczyszczenia [Podgórska i in. 2007].

Wyodrębnionych zostało wiele rodzajów biosensorów. W zależności od molekularnego mechanizmu reakcji oraz regulacji promotor – gen reporterowy wyróżnia się trzy główne typy: niespecyficzne całokomórkowe biosensory (non specific whole-cell biosensors), specyficzne całokomórkowe biosensory (specific whole-cell biosensors) oraz indukowane stresem całokomórkowe biosensory (stress-induced whole-cell biosensors) zwane biosensorami semispecyficznymi [Matejczyk 2004, Shin 2011].

Zastosowanie wszystkich typów biosensorów stale wzrasta. Atrakcyjność stosowania biocujników wynika głównie z ich wysokiej czułości i selektywności względem badanej substancji. Obecnie wykorzystuje się je do identyfikacji obcego DNA, białek, szeregu metabolitów i skażeń chemicznych (toksyny) oraz biologicznych (wirusy, bakterie). Biosensory są niezastąpionym narzędziem wykorzystywanym do określania ilości metali ciężkich, BZT, a także substancji toksycznych (pestycydów, mykotoksyn, antybiotyków i innych leków) w powietrzu, wodzie i glebie. Ponadto wykorzystuje się je jako narzędzie przy identyfikacji genetycznie zmodyfikowanych organizmów w żywności [Tudek 2002, Radecki i in. 2006].

W związku z powyższym w przedłożonej pracy oszacowano wrażliwość i przydatność konstruktów genowych *katG::lux* w *E. coli* K-12 RFM 443 jako bakteryjnego biosensora (biocujnika) do monitorowania pozostałości farmaceutycznych jednego z najpowszechniej stosowanych w leczeniu ludzi leku kardiologicznego – metoprololu, należącego do grupy β – blokerów. W przeprowadzonych badaniach poziom cytotoxyczności leku w układzie promotor *katG* z genem reporterowym *lux* określono na podstawie dynamiki wartości OD – optycznej gęstości (ang. Optical Density) hodowli bakteryjnej, natomiast poziom genotoksyczności farmaceutyku oszacowano na podstawie dynamiki intensywności luminescencji będącej wynikiem siły pobudzenia ekspresji genu *lux* przez lek, czyli wpływu tego leku na poziom ekspresji genu *lux* w układzie genetycznym *katG::lux*. Głównym przedmiotem wykonanych analiz był metoprolol – kardioselektywny β -bloker (chemicznie winian metoprololu, o wzorze sumarycznym $C_{15}H_{25}NO_3$), stosowany w leczeniu chorób o podłożu kardiologicznym, zakupiony w jednej z białostockich aptek.

METODYKA BADAŃ LABORATORYJNYCH

Badaniom poddanych zostało pięć stężeń farmaceutyku od 10^{-1} mg/cm³ do 10^{-5} mg/cm³. Organizmem modelowym do badania cyto- i genotoksyczności był szczep *Escherichia coli* K-12 *katG::lux* i *Escherichia coli* K-12 *promoterless::DH5a/pBR2TTS-pless*. Biosensor RFM/*katG::lux* należy do całokomórkowych biosensorów bakteryjnych indukowalnych stresem, zwanych inaczej biosensorami semispecyficznymi. Do jego konstrukcji wykorzystany został szczep *Escherichia coli* K-12 RFM 443 o genotypie (F-*galK2lac74rpsL200*) [Yagur-Kroll i in. 2010]. Omawiany czujnik biologiczny zawierał w sobie połączenie promotora *katG* oraz genu reporterowego *lux*, dzięki któremu emitowany był sygnał bioluminescencyjny. Wektorem dla wykorzystanego konstruktów *katG::luxA* był plazmid pBR322 niosący pochodną *katG::luxAB* [Yagur-Kroll i Belkin 2011].

Otrzymane dzięki uprzejmości Dr Sharon Yagur-Kroll i Prof. Shimshona Belkina z Hebrew University of Jerusalem, Izrael szczepy bakteryjne z hodowli na pożywcę stałej przeniesiono do agaru LB i inkubowano w temperaturze 30°C z dodatkiem ampicyliny o stężeniu 100 μ g/cm³. Następnie kolonie przeniesiono do bulionu LB (podłoże płynne) z dodatkiem antybiotyku. Tak przygotowany bulion inkubowano, celem wzrostu hodowli bakteryjnej, w temperaturze 37°C przez 24 godziny.

Po upływie czasu inkubacji komórki bakteryjne odwirowano w wirówce przy wartości 7000 rpm i przemyto w 0.86% NaCl, którego zadaniem było zapewnienie odpowiedniej osmotyczności.

Szczepy przeniesiono następnie do buforu PBS i poddano dalszym analizom.

W początkowej fazie eksperymentu wystandaryzowano inicjalną gęstość optyczną bakterii – OD (ang. Optical Density) do wartości 0.2 z użyciem spektrofotometru przy długości fali 600 nm. Metodą seryjnych rozcieńczeń określono stężenie bakterii w 0.86% NaCl na cm³ wyrażone jako wartość jtk/cm³ (jednostki tworzące kolonie). Dynamikę wzrostu hodowli bakteryjnej poddanej działaniu metoprololu monitorowano spektrofotometrycznie (przy długości fali $\lambda = 600$ nm). Wartość stymulacji wzrostu hodowli bakteryjnej GS – (ang. Growth Stimulation) w trakcie inkubacji wyliczono według wzoru:

$$GS(\%) = ODDS(\%) - ODCS(\%) \quad (1)$$

gdzie: $ODDS(\%)$ – optyczna gęstość hodowli bakteryjnej poddanej działaniu metoprololu, $ODCS(\%)$ – optyczna gęstość kontroli = 100%.

W kolejnej fazie eksperymentu nastąpiła inkubacja hodowli bakteryjnych. 1 cm³ inokulum stacjonarnej fazy wzrostu hodowli bakteryjnych (o stężeniu 1×10^8 jtk/cm³ i gęstości optycznej OD = 0.2) rozcieńczono w 4 cm³ buforu PBS. Do testów cytotoxycywności i genotoksycywności zastosowano metoprolol w zakresie stężeń od 10⁻¹ mg/cm³ do 10⁻⁵ mg/cm³.

Eksperyment z użyciem szczepów *Escherichia coli* K-12 *katG::lux* prowadzono łącznie przez 24 godziny. Odczyt cyto- i genotoksycznego efektu oddziaływania leku w stosunku do *E. coli* wykonano po 3 i 24 godzinach (celem określenia wrażliwości analizowanego konstruktów genowego w szybkiej oraz późnej odpowiedzi komórkowej). Próbkę kontrolną prowadzono równolegle z zastosowaniem szczepu *Escherichia coli* K-12 *katG::lux* i nie poddawano jej działaniu leku. Celem weryfikacji aktywności zastosowanego promotora użyto szczepu *Escherichia coli* K-12 *promoterless::DH5a/pBR2TTS- β luc* jako kontroli negatywnej.

Po upływie odpowiedniego czasu ekspozycji hodowli bakteryjnej na badany farmaceutyk dokonano pomiaru bioluminescencji bakteryjnej lucyferazy. Pomiar przeprowadzono zgodnie z wartością optymalnego poziomu wzbudzenia genu reporterowego *lux* przy długości fali wzbudzającej $\lambda = 478$ nm oraz emisyjnej $\lambda = 505$ nm.

Celem oszacowania poziomu oddziaływania metoprololu na hodowle bakteryjne określono wartość RLU (ang. Relative Luminescence Units) – względnych jednostek luminescencji, równą ilorazowi wartości luminescencji oraz optycznej gęstości (OD) mierzonej w każdym punkcie pomiaru przy długości fali 600 nm. RLU wyliczono według wzoru:

$$RLU = \frac{\text{Luminescencja}}{OD} \quad (2)$$

gdzie: *Luminescencja* – wartość luminescencji, *RLU* – Względne Jednostki Luminescencji (ang. Relative Luminescence Units), *OD* – Optyczna Gęstość ($\lambda = 600$ nm).

Dla każdego z analizowanych stężeń farmaceutyku wyliczono także zahamowanie poziomu ekspresji genu *lux* wg następującego wzoru:

$$Iluxexp.(\%) = RLUCS(\%) - RLUDS(\%) \quad (3)$$

gdzie: $RLUCS(\%)$ – wartość RLU kontroli = 100%, $RLUDS(\%)$ – wartość RLU próbek poddanych działaniu metoprololu.

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej testem *t*-Studenta. Za istotne statystycznie przyjęto wyniki dla $p < 0.05$. Dla każdej serii badawczej ($n = 8$ powtórzeń) wyliczono wartości średnie oraz odchylenie standardowe. Wyniki zestawiono dla 8 powtórzeń każdego stężenia wraz z próbkami kontrolnymi.

Pomiary parametrów absorbancji oraz luminescencji przeprowadzono przy użyciu wielofunkcyjnego czytnika płytek Glomax[®] firmy Promega.

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Analiza cytotoxycywności metoprololu

Analizę cytotoxycywności badanego β – blokeru oparto o uzyskane wyniki gęstości optycznej próbek z konkretnymi stężeniami leku względem próbki kontrolnej (tabela 1). Na podstawie otrzymanych danych wyliczono wartość stymulacji wzrostu hodowli bakteryjnej (rysunek 1), będącej skutkiem biologicznej aktywności leku i jego wpływu na poziom ekspresji genu *lux* oraz aktywność promotora *katG*.

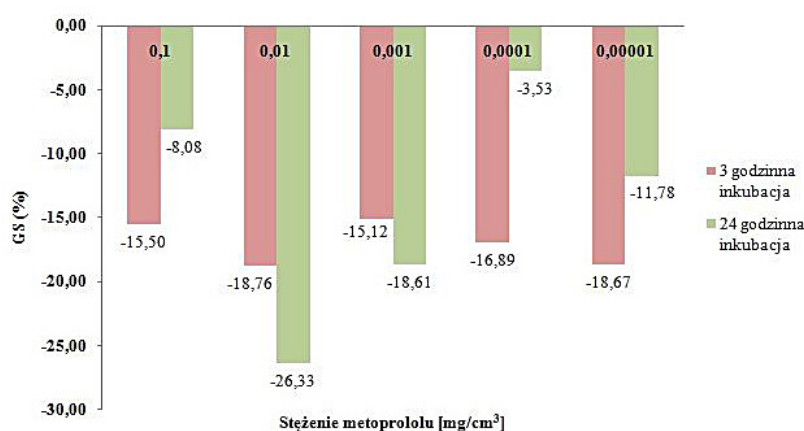
Efekt cytotoxycywny oddziaływania metoprololu, w postaci spadku gęstości optycznej (OD) komórek bakteryjnych *E. coli katG::lux* zaobserwowano w pełnym testowanym zakresie stężeń leku (od 10⁻⁵ do 10⁻¹ mg/cm³), zarówno podczas szybkiej, jak i późnej odpowiedzi komórkowej. Zarejestrowano zróżnicowaną reaktywność konstruktów genowych *katG::lux* względem stosowanych w pracy stężeń farmaceutyku. Wartości dynamiki wzrostu (GS) hodowli bakteryjnej wyrażały zatem siłę oddziaływania testowanego leku na czułość konstruktów *katG::lux*.

W porównaniu do próbki kontrolnej, 3 – godzinna inkubacja szczepów *E. coli katG::lux* z metoprololem spowodowała zahamowanie wzrostu komórek bakteryjnych na poziomie od -15.12% do -18.76%. W przypadku całodobowego oddziaływania leku, wartości te zawierały się w zakresie od -3.53% do -26.33%. Maksymalna inhibicja wzrostu *E. coli katG::lux* zaobserwowa-

Tabela 1. Wartości gęstości optycznej (OD) dla *E. coli* K-12 *katG::lux* poddanych działaniu metoprololu w porównaniu z próbką kontrolną

Stężenie leku [mg/cm ³]	Gęstość optyczna (OD) ± SD	
	3 godzinna inkubacja	24 godzinna inkubacja
Próbka kontrolna	0,235 ± 0,153	0,257 ± 0,170
10 ⁻⁵ mg/cm ³	0,191 ± 0,005	0,227 ± 0,034
10 ⁻⁴ mg/cm ³	0,196 ± 0,008	0,248 ± 0,041
10 ⁻³ mg/cm ³	0,200 ± 0,005 ^b	0,209 ± 0,036 ^c
10 ⁻² mg/cm ³	0,191 ± 0,007 ^d	0,189 ± 0,020 ^{bc}
10 ⁻¹ mg/cm ³	0,199 ± 0,008 ^{be}	0,236 ± 0,041 ^e

Wyniki przedstawiają wartości średnie dla $n = 8$ i odchylenia standardowe średniej (\pm SD): a – istotne statystycznie w porównaniu do kontroli ($p < 0.05$); b – istotne statystycznie w porównaniu do stężenia 10⁻⁵ mg/cm³, ($p < 0.05$); c – istotne statystycznie w porównaniu do stężenia 10⁻⁴ mg/cm³, ($p < 0.05$); d – istotne statystycznie w porównaniu do stężenia 10⁻³ mg/cm³, ($p < 0.05$); e – istotne statystycznie w porównaniu do stężenia 10⁻² mg/cm³, ($p < 0.05$).



Rys. 1. Dynamika wzrostu (GS) hodowli bakteryjnej *E. coli katG::lux* po 3 i 24 godzinach działania metoprololu
Fig. 1. The growth dynamics (GS) of bacterial culture *E. coli katG::lux* after 3 and 24 hours treatment of metoprolol

na została w stężeniu metoprololu równym 10⁻² mg/cm³ i po 24 godzinach inkubacji. Nieznaczące oddziaływanie wykazał β – bloker o koncentracji 10⁻⁴ mg/cm³, przy tym samym okresie ekspozycji bakterii na lek.

Monitoring wzrostu hodowli bakteryjnej wskazał na występowanie istotności statystycznych pomiędzy uzyskanymi wynikami gęstości optycznej (OD) dla konkretnych stężeń metoprololu. W zakresie 3 – godzinnej interakcji szczepów z lekiem odnotowano powinowactwo statystyczne pomiędzy następującymi grupami koncentracji: 10⁻³ mg/cm³ i 10⁻⁵ mg/cm³ ($p < 0.05$); 10⁻² mg/cm³ i 10⁻³ mg/cm³ ($p < 0.05$); 10⁻¹ mg/cm³ i 10⁻² mg/cm³ ($p < 0.05$), a także 10⁻¹ mg/cm³ i 10⁻⁵ mg/cm³ ($p < 0.05$). W odniesieniu do interakcji całodobowej istotności statystyczne wykazano w zakresie stężeń: 10⁻³ mg/cm³ i 10⁻⁴ mg/cm³ ($p < 0.05$); 10⁻² mg/cm³ i 10⁻⁴ mg/cm³ ($p < 0.05$); 10⁻² mg/cm³ i 10⁻⁵ mg/cm³ ($p < 0.05$) oraz 10⁻¹ mg/cm³ i 10⁻² mg/cm³ ($p < 0.05$).

Na podstawie otrzymanych w eksperymencie wyników stwierdzono efekt cytotoksyczny leku, zarówno po 3 jak i 24 godzinnej ekspozycji bakterii na metoprolol. Przedłożone badania czynią zatem zasadnym potencjalne wykorzystanie szczepów *E. coli* K-12 RFM 443 *katG::lux* w monitoringu cytotoksyczności β – blokerów w środowisku naturalnym.

Analiza genotoksyczności metoprololu

Analizę stopnia genotoksyczności metoprololu oparto o wyliczone wartości względnych jednostek luminescencji (RLU) dla zdefiniowanych koncentracji leku w stosunku do próbki kontrolnej (tabela 2). Na tej podstawie określono stopień inhibicji ekspresji genu *lux* w fuzji z promotorem *katG* (rysunek 2), będący miarą genotoksycznej aktywności badanego β – blokeru.

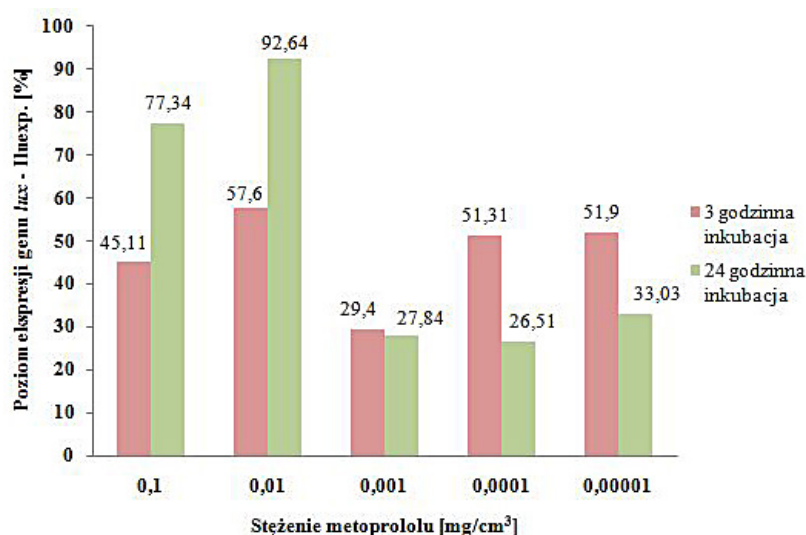
W przeprowadzonym eksperymencie modulację ekspresji genu *lux* w *E. coli katG::lux* osią-

Tabela 2. Wartości względnych jednostek luminescencji (RLU) dla *E. coli* K-12 *katG::lux* poddanych działaniu metoprololu w porównaniu z próbką kontrolną

Table 2. Relative luminescence units (RLU) values for *E. coli* K-12 *katG::lux* treated with metoprolol in comparison with the control sample

Stężenie leku [mg/cm ³]	RLU ± SD	
	3 godzinna inkubacja	24 godzinna inkubacja
Próbka kontrolna	85368,78 ± 33238,27	8107,74 ± 3703,18
10 ⁻⁵ mg/cm ³	129674,37 ± 18286,17	10785,79 ± 3773,71
10 ⁻⁴ mg/cm ³	129175,49 ± 23850,55	10256,77 ± 4152,25
10 ⁻³ mg/cm ³	110464,18 ± 13999,34 ^{be}	10364,90 ± 3780,67
10 ⁻² mg/cm ³	134540,70 ± 18651,37 ^d	15618,76 ± 5415,38 ^{bcd}
10 ⁻¹ mg/cm ³	123876,04 ± 20253,95 ^a	14378,25 ± 5785,16 ^a

Wyniki przedstawiają wartości średnie dla n = 8 i odchylenia standardowe średniej (±SD): a – istotne statystycznie w porównaniu do kontroli (p<0.05); b – istotne statystycznie w porównaniu do stężenia 10⁻⁵ mg/cm³, (p<0.05); c – istotne statystycznie w porównaniu do stężenia 10⁻⁴ mg/cm³, (p<0.05); d – istotne statystycznie w porównaniu do stężenia 10⁻³ mg/cm³, (p<0.05); e – istotne statystycznie w porównaniu do stężenia 10⁻² mg/cm³, (p<0.05).



Rys. 2. Poziom ekspresji genu *lux* hodowli bakteryjnej *E. coli katG::lux* po 3 i 24 godzinach działania metoprololu

Fig. 2. The expression level of the *lux* gene of bacterial culture *E. coli katG::lux* after 3 and 24 hours treatment of metoprolol

gnięto we wszystkich testowanych stężeniach metoprololu (od 10⁻⁵ do 10⁻¹ mg/cm³) oraz przy zmiennym 3 i 24 godzinnym czasie inkubacji. Bakterie zareagowały z różną luminescencyjną efektywnością na analizowane koncentracje farmaceutyku. W otrzymanych wynikach odnotowano znaczący wzrost (p<0.05) wartości RLU w próbkach z lekiem w porównaniu do próbki kontrolnej. Wartości RLU i Iluexp. były indykatozem obrazującym wrażliwość układu genetycznego *katG::lux* w *E. coli* oraz wpływ stresu oksydacyjnego na metabolizm bakterii.

Zarówno 3, jak i 24 godzinne oddziaływanie metoprololu na szczepy bakteryjne wpłynęło na poziom ekspresji genu *lux* oraz zintensy-

fikowało wartości RLU i Iluexp. przy każdym zastosowanym stężeniu leku w porównaniu do próbki kontrolnej. 3 godzinna inkubacja szczepu *E. coli katG::lux* z metoprololem spowodowała wzrost poziomu ekspresji genu *lux* w bakteriach na poziomie od 29.4% do 57.6%. W przypadku całodobowego oddziaływania leku, wartości te zawierały się w zakresie od 26.51% do 92.64%. Maksymalne pobudzenie ekspresji genu *lux* w *E. coli katG::lux* odnotowano przy stężeniu metoprololu równym 10⁻² mg/cm³ po całodobowej inkubacji, zaś najmniejszy procentowy przyrost wartości RLU zarejestrowano w stężeniu 10⁻⁴ mg/cm³ i po tym samym czasie ekspozycji. Przedłożone badania wskazały na efektywniejszą

reaktywność (wrażliwość) konstruktów genowego *katG::lux* w *E. coli* po 3 godzinnej inkubacji bakterii z lekiem niż po 24 godzinnej ekspozycji, szczególnie w następujących stężeniach leku: 10^{-3} , 10^{-4} oraz 10^{-5} mg/cm³.

Ponadto wyliczone wartości RLU potwierdziły występowanie istotności statystycznych pomiędzy określonymi grupami stężeń badanego β – blokeru. Podczas 3 godzinnej inkubacji szczepów z metoprololem wykazano powinowactwo statystyczne pomiędzy następującymi grupami koncentracji stosowanego leku: 10^{-3} mg/cm³ i 10^{-5} mg/cm³ ($p < 0.05$); 10^{-3} mg/cm³ i 10^{-2} mg/cm³ ($p < 0.05$); 10^{-2} mg/cm³ i 10^{-3} mg/cm³ ($p < 0.05$), a także 10^{-1} mg/cm³ w odniesieniu do próbki kontrolnej ($p < 0.05$). W przypadku interakcji całodobowej istotności statystyczne odnotowano dla stężeń: 10^{-2} mg/cm³ i 10^{-5} mg/cm³ ($p < 0.05$); 10^{-2} mg/cm³ i 10^{-4} mg/cm³ ($p < 0.05$); 10^{-2} mg/cm³ i 10^{-3} mg/cm³ ($p < 0.05$) oraz 10^{-1} mg/cm³ w porównaniu do próbki kontrolnej ($p < 0.05$).

Na podstawie przedstawionych zależności stwierdzono więc, iż istnieje możliwość potencjalnego wykorzystania biosensora bakteryjnego *Escherichia coli* K-12 RFM 443 z fuzją genową *katG::lux* w monitoringu genotoksyczności pozostałości metoprololu w środowisku.

WNIOSKI

1. Mikrobiologiczny biosensor bakteryjny zawierający fuzję genową *katG::lux* wykazuje wyraźną wrażliwość wobec metoprololu użytego w badaniach – we wszystkich przypadkach odnotowano inhibicję wzrostu (efekt cytotoksyczny) komórek bakteryjnych.
2. Metoprolol we wszystkich testowanych stężeniach, a także w zmiennym czasie inkubacji (3 oraz 24 godziny) jest modulatorem ekspresji genu *lux* w *E. coli katG::lux*.
3. Krótszy czas inkubacji hodowli bakteryjnych narażonych na działanie metoprololu wpływa w większym stopniu na podwyższenie intensywności emitowanej luminescencji w odniesieniu do inkubacji całodobowej w przypadku stężeń leku na poziomie 10^{-3} , 10^{-4} oraz 10^{-5} mg/cm³.
4. Otrzymane wyniki świadczą o potencjalnej możliwości zastosowania biosensora bakteryjnego *Escherichia coli* K – 12 RFM 443 z fuzją genową *katG::lux* w monitoringu cytotoxyczności i genotoksyczności pozostałości metoprololu w środowisku.

Podziękowania

Autorzy składają serdeczne podziękowania dla Dr Sharon Yagur-Kroll i Prof. Shimshona Belkina z Hebreu University of Jerusalem, Izrael za nieodpłatne użyczenie konstruktów genowych z genem *lux*. Praca zrealizowana została w ramach projektu statutowego S/WBiIS/3/2015.

LITERATURA

1. Belkin S. 2003. Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants. *Current Opinion in Microbiology*, (6), 206–212.
2. Cierniak-Piotrowska M., Marciniak G., Stańczak J. 2015. Statystyka zgonów i umieralności z powodu chorób układu krążenia. [W:] Strzelecki Z., Szymborski J. (red.). *Zachorowalność i umieralność na choroby układu krążenia a sytuacja demograficzna Polski*. Rządowa Rada Ludnościowa, Warszawa, 46–81.
3. Czech B. 2012. Usuwanie farmaceutyków z wód i ścieków z wykorzystaniem metod adsorpcyjnych i fotokatalitycznych. [W:] Ryczkowski J. (red.). *Adsorbenty i katalizatory. Wybrane technologie, a środowisko*. Rzeszów, 443–452.
4. D'Souza S.F. 2001. Microbial biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 16, 337–353.
5. Felis E., Miksch K., Sikora J. 2005. Występowanie i możliwości usuwania farmaceutyków w Polsce. Materiały konferencyjne. VII Ogólnopolska Sesja Popularnonaukowa „Środowisko a zdrowie”.
6. Guchelaar H.J., Chandi L., Schouten O., Van den Brand W. A. 1999. A high performance liquid chromatographic method for the screening of 17 diuretics in human urine. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, vol. 363, no. 7, 700–705.
7. Janiec W. 2005. *Kompedium farmakologii*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
8. Kasprzyk-Hordern B., Dinsdale R.M., Guwy A. J. 2009. The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. *Water Research*, 43, 363–380.
9. Kot-Wasik A., Dębska J., Namieśnik J. 2003. Przemiany stężenia i oznaczanie pozostałości farmaceutycznych w środowisku. [W:] Namieśnik J., Chrzanowski W., Szpinek P. (red.). *Nowe horyzonty i wyzwania w analityce i monitoringu środowiskowym*. Centrum Doskonałości Analityki i Monitoringu Środowiskowego, Gdańsk, Rozdział 34.
10. Matejczyk M. 2004. Bakteryjne biosensory. *Postępy mikrobiologii*, 2 (43), 155–165.

11. Matejczyk M. 2010. Potencjał aplikacyjny biosensorów mikrobiologicznych. *Postępy biotechnologii*, 49, 297–304.
12. Nikolaou A., Meric S., Fatta D. 2007. Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 1225–1234.
13. Podgórska P., Pazdro K., Węgrzyn G. 2007. The use of the *Vibrio harveyi* luminescence mutagenicity assay as a rapid test for preliminary assessment of mutagenic pollution of marine sediments. *Journal of Applied Genetics*, 48, 409–412.
14. Rzepa J. 2009. Oznaczanie leków i pestycydów w wodach powierzchniowych. [W:] Głoda B. K. (red.). *Postępy chromatografii*. Wyd. Akademii Podlaskiej, Siedlce, 67–79.
15. Shin H.J. 2011. Genetically engineered microbial biosensors for in situ monitoring of environmental pollution. *Microbial Biotechnology*, 4 (89), 867–877.
16. Sosnowska K., Styszko-Grochowiak K., Gołaś J. 2009. Leki w środowisku – źródła, przemiany, zagrożenia. *Krakowska Konferencja Młodych Uczonych*, 395.
17. Szymonik A., Lach J. 2012. Zagrożenie środowiska wodnego obecnością środków farmaceutycznych. *Inżynieria i Ochrona Środowiska*, t. 15, nr 3, 249–263.
18. Tudek B. 2002. Zastosowanie genetycznie zmodyfikowanych mikroorganizmów a działania Unii Europejskiej i Polski dla zachowania bezpieczeństwa biologicznego. *Biotechnologia*, 4 (59), 239–260.
19. Radecki J., Radecka H., Cieśla J., Tudek B. 2006. Sensory chemiczne i biosensory w kontroli żywności zmodyfikowanej genetycznie. *Prace przeglądowe. Biotechnologia* (74), 67–78.
20. Valcarcel Y., Gonzalez Alonso S., Rodriguez-Gil J. L., Romo Maroto R. 2011. Analysis of the presence of cardiovascular and analgesic/anti-inflammatory/antipyretic pharmaceutical in river and drinking water of the Madrid Region in Spain. *Chemosphere*, 82, 1062–1071.
21. Yagur-Kroll S., Bilic B., Belkin S. 2010. Strategies for enhancing bioluminescent bacterial sensor performance by promoter region manipulation. *Microbial Biotechnology*, 3 (3), 300–310.
22. Yagur-Kroll S., Belkin S. 2011. Upgrading bioluminescent bacterial bioreporter performance by splitting the *lux* operon. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400, 1071–1082.