

Streszczenie pracy doktorskiej:

Studies of the effects of persistent organic pollutants on model biomembranes of soil decomposers

Przygotowana rozprawa doktorska dotyczy wpływu trwałych zanieczyszczeń organicznych (TZO) na modelowe błony komórkowe destruentów glebowych, a w szczególności na właściwości fizyczne tych modelowych układów.

Trwałe zanieczyszczenia organiczne (TZO) to grupa związków organicznych, które są toksyczne, charakteryzują się znaczną trwałością w środowisku i zdolnością do bioakumulacji i biokondensacji. Z punktu widzenia chemicznego są to najczęściej cząsteczki polihalogenowane: polifluorowane, polichlorowane lub polibromowane, zaś liczne podstawniki halogenowe odpowiadają za stabilność chemiczną TZO. Jedną z najważniejszych prawnych regulacji, pod która podlegają TZO to Konwencja Sztokholmska, która weszła w życie 2004 roku i ma na celu ochronę środowiska naturalnego i zdrowia ludzkiego przed szkodliwym działaniem TZO. Na pierwszej liście TZO znalazło się dwanaście polichlorowanych związków organicznych, zwane również „parszywą dwunastką”. Lista TZO Konwencji Sztokholmskiej jest nieustannie uzupełniana o nowe substancje. Trwałość TZO związana jest głównie z długim czasem półtrwania tych związków w glebach i osadach dennych. Co więcej jak wskazują wysokie wartości współczynników podziału oktanol/woda duża część TZO to związki wysoce hydrofobowe oraz wykazujące wysokie powinowactwo do błon komórkowych, dla tego też TZO mogą kumulować się w tkankach organizmów. Po przedostaniu się do środowiska naturalnego TZO rozprzestrzeniają się głównie w atmosferze i mogą docierać do obszarów znacząco oddalonych od źródła emisji. Doskonałym przykładem jest obecność TZO w Arktyce, Antarktydzie i obszarach położonych w wysokich górach. W pierwszej kolejności na skażenie TZO narażone są gleby i osady denne. Ze względu na charakter hydrofobowy większości TZO, cząsteczki tych związków adsorbują się na powierzchni minerałów glebowych lub absorbują w minerałach porowatych. Zjawiska te prowadzą do zmniejszenia biodostępności tych związków dla mikroorganizmów glebowych.

Biorąc pod uwagę efektywność i znikomą ingerencję w środowisko naturalne, obiecującą metodą usuwania TZO z gleb i osadów dennych jest bioremediacja. Proces ten polega na wykorzystaniu zdolności mikroorganizmów glebowych, takich jak bakterie i grzyby, zwanych również destruentami glebowymi, do pełnej mineralizacji TZO lub też przekształcania ich do mniej toksycznych metabolitów. Jedną z najczęściej stosowanych metod bioremediacji jest bioaugmentacja, która polega na wprowadzaniu odpowiednich szczepów bakterii lub grzybów, zdolnych do degradacji TZO, do gleb skażonych przez te substancje. Metoda ta jednak często okazuje się nieskuteczną z powodu toksyczności TZO w stosunku do destruentów glebowych. Większość TZO to hydrofobowe związki organiczne, które mogą wykazywać wysokie powinowactwo do błon komórkowych. W procesach biodegradacji TZO przez mikroorganizmy glebowe w pierwszej kolejności dochodzi do wbudowania cząsteczek TZO do błon komórkowych destruentów. Jest to etap niezbędny metabolizmu tych substancji. Zwykle pierwszy etap ich degradacji polega na utlenieniu przez enzymy związane z błonami, jak cytochrom P450, monooksygenazy, czy dehalogenazy. Dalsze etapy degradacji mogą być również związane z błoną plazmatyczną lub też polarne metabolity TZO transportowane są do cytoplazmy komórek destruentów i tam poddawane dalszej degradacji. Jednakże gromadzenie się cząsteczek TZO w błonie plazmatycznej może spowodować poważne zaburzenia jej funkcjonalności, istotnie wpływając na właściwości fizyczne membrany. Obecność TZO w błonie może wpływać na jej płynność i przepuszczalność oraz na aktywność białek błonowych, w tym rozmaitych enzymów kluczowych dla funkcjonowania komórki. Negatywne zmiany związane z gromadzeniem się TZO w błonach plazmatycznych bakterii i grzybów glebowych mogą doprowadzić do śmierci tych komórek, a w szerszej perspektywie doubożenia biocenoz destruentów glebowych i spowolnienia procesów degradacji martwej materii organicznej w glebie.

Niektóre bakterie i grzyby, rozwinęły mechanizmy przeciwdziałające negatywnym skutkom obecności TZO w błonie plazmatycznej, przede wszystkim modyfikując skład fosfolipidowy membrany, tak by obecne w niej cząsteczki TZO w jak najmniejszym stopniu wpływały na jej funkcjonalność.

Idąc tym tropem można stwierdzić, że niektóre mikroorganizmy lepiej funkcjonują w glebach skażonych TZO, a inne znacznie gorzej, a ich przystosowanie lub brak przystosowania do obecności TZO w glebie i zdolność lub brak zdolności do degradacji tych związków są bezpośrednio związane z budową błony plazmatycznej. Stwierdzenie to prowadzi do głównej hipotezy badawczej niniejszej rozprawy doktorskiej. Otóż założono, że toksyczność TZO względem mikroorganizmów jest bezpośrednio związana ze składem lipidowym błony

plazmatycznej. Poznanie korelacji pomiędzy składem lipidowym a toksycznością istotnych środowiskowo TZO pozwoliłoby na skuteczniejsze dobieranie szczepów bakterii i grzybów do procesu bioaugmentacji stosowanego w bioremediacji gleb skażonych tymi substancjami.

Ze względu na złożoność budowy membran bakterii lub grzybów, w niniejszej pracy postanowiono wykorzystać monowarstwy Langmuira jako uproszczony model błon plazmatycznych bakterii Gram dodatnich, wewnętrznej błony plazmatycznej bakterii Gram ujemnych oraz błon plazmatycznych grzybów.

Jedno i dwuskładnikowe monowarstwy Langmuira, stosowane jako modele biomembran, były tworzone przez klasy fosfolipidów które najczęściej występują w błonach plazmatycznych wyżej wymienionych mikroorganizmów: fosfatydyloetanolaminy (PE) będące głównymi składnikami wewnętrznych błon plazmatycznych bakterii Gram ujemnych, karidiolipiny (CL) i fosfatydyloglicerole (PG) stanowiące główne składniki błon plazmatycznych bakterii Gram dodatnich oraz fosfatydylocholino (PC) będące głównymi fosfolipidami błon grzybów glebowych. Do badań zostały wybrane TZO, o których wiadomo z literatury naukowej, że są bardzo rozpowszechnione w środowisku, na wszystkich kontynentach i szerokościach geograficznych oraz że powodują poważne skażenia gleb. Związki te można podzielić na trzy grupy: perfluorowane węglowodory i ich polarne pochodne, polichlorowane pestycydy oraz polichlorowane bifenyle. Dodatkowo do badań wybrano również rozpuszczalne w wodzie metabolity badanych TZO które często są bardziej toksyczne dla mikroorganizmów glebowych od wyjściowych hydrofobowych molekuł TZO. W pierwszej kolejności badano mechaniczne właściwości modelowych biomembran. Badane monowarstwy Langmuira poddawano kompresji rejestrując izotermy ciśnienia powierzchniowego w funkcji średniej powierzchni przypadającej na cząsteczkę w monowarstwie. Ponadto badane modelowe membrany charakteryzowano z pomocą licznych komplementarnych mikroskopowych, spektroskopowych i rentgenowskich technik eksperymentalnych. Do wizualizacji morfologii badanych układów modelowych zastosowano mikroskopię kąta Brewstera (BAM). Do badania upakowania cząsteczek fosfolipidów w monowarstwie w skali molekularnej zastosowano technikę dyfrakcji promieniowania synchrotronowego GIXD (grazing incidence X-ray diffraction). Obie techniki dostarczają głównie informacje o sposobie porządkowania się i samoorganizacji łańcuchów węglowodorowych w monowarstwie. By uzyskać również informacje o organizacji głów polarnych fosfolipidów w badanych modelowych membranach zastosowano dedykowaną dla takich układów spektroskopię PM-IRRAS (polarization modulated infrared reflection-absorption spectroscopy). Wszelkie badania prowadzono

porównawczo charakteryzując modelowe membrany nie zawierające cząsteczek TZO oraz te wzbogacone cząsteczkami TZO.

Wyniki pokazały, że oddziaływania TZO/fosfolipidy nie tylko zależą od klasy fosfolipidów tworzących monowarstwę, ale w przypadku monowarstw dwuskładnikowych w znacznym stopniu od wzajemnej proporcji fosfolipidów. W dyskusji wpływu badanych TZO na właściwości modelowych biomembran bardzo istotna okazała się struktura cząsteczek TZO. Okazało się, że związki będące izomerami w bardzo różny sposób wpływały na właściwości badanych monowarstw. W szczególności można było to zaobserwować w badaniach dotyczących polichlorowanych bifenyli, gdzie zmiana położenia jednego atomu chloru drastycznie zmieniała aktywność membranową tych cząsteczek.

Aktywność membranową TZO często w literaturze wiąże się z hydrofobowością tych związków mierzona współczynnikiem podziału oktanol/woda (K_{ow}). Można by zakładać, że im większa wartość $\log K_{ow}$ tym większa aktywność membranowa cząsteczek TZO. Przeprowadzone badania wykazały jednak, że takie podejście jest zbyt uproszczone i, że zdecydowanie ważniejsza jest struktura danego związku. Odpowiednie rozmieszczenie podstawników chlorowych w związkach polichlorowanych powoduje, że mogą się one skutecznie wbudować pomiędzy łańcuchy węglowodorowe fosfolipidów tworzących monowarstwę. Jak już wspomniano zmiana położenia jednego atomu chloru w cząsteczce TZO może diametralnie zmienić jej właściwości membranowe, uniemożliwiając skuteczną inkorporację tych cząsteczek do modelowej membrany. Przeprowadzone badania pozwoliły wskazać cząsteczki istotnych środowiskowo TZO, które nie wbudowują się do monowarstw Langmuira. W takiej sytuacji w realiach prowadzonych eksperymentów cząsteczki te albo tworzą wielowarstwowe agregaty na granicy faz woda/powietrze albo też warstwy adsorpcyjne o grubości jednej cząsteczki na monowarstwie fosfolipidu. Te dwie sytuacje były łatwe do rozróżnienia przy zastosowaniu mikroskopii BAM. Udało się wykazać, że cząsteczki TZO zawierające wiele atomów chloru lub całkowicie perchlorowane tworzą wielowarstwowe agregaty, natomiast cząsteczki perfluorowane monowarstwy adsorpcyjne. Szczególnie dobrze widać tę tendencję na przykładzie pary perfluorobifenyl/perchlorobifenyl.

Przeprowadzono również badania wpływu rozpuszczalnych w wodzie metabolitów badanych TZO na właściwości fizyczne badanych modelowych biomembran. Tu szczególnie skuteczne okazały się testy penetracji polegające na wstrzykiwaniu stężonego etanolowego roztworu badanego metabolitu do subfazy pod monowarstwę skompresowaną do zadanego ciśnienia powierzchniowego. Okazało się, że rozpuszczalne w wodzie metabolity TZO mogą powodować destrukcję badanych monowarstw w znacznie większym stopniu niż wyjściowe

hydrofobowe cząsteczki TZO. Szczególnie jaskrawym przykładem jest tutaj pentachlorofenol będący metabolitem dwóch pestycydów należących do TZO: heksachlorobenzenu i heksachlorocykloheksanu. Okazało się, że obie te cząsteczki wywierały nieznaczny wpływ na badane modele biomembran: nie wbudowywały się do tych modeli niezależnie od ich składu, natomiast tworzyły warstwy adsorpcyjne na ich powierzchni. Ich metabolit pentachlorofenol okazał się w znacznym stopniu zaburzać organizację modelowych membran, również tych szczególnie odpornych na negatywne skutki związane z inkorporacją TZO.

Wyniki uzyskane dla układów modelowych oceniono również pod kątem możliwości wykorzystania ich w bioaugmentacji, czyli wskazania przy jakim składzie lipidowym błony plazmatycznej mikroorganizmy mogłyby być najbardziej skuteczne w remediacji gleb skażonych konkretnymi TZO. Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że najbardziej perspektywiczne byłyby tu układy modelowe o znacznej zawartości kardiolipiny. Cząsteczki badanych TZO były w stanie wbudowywać się do takich monowarstw, a jednocześnie ich inkorporacja powodowała jedynie niewielkie zmiany właściwości fizycznych tych układów. Można by stąd wyciągnąć wniosek, że bakterie Gram dodatnie, których błony plazmatyczne są zbudowane głównie z fosfolipidów anionowych: kardiolipin i fosfatydylogliceroli mogłyby być najbardziej skuteczne w bioremediacji gleb skażonych badanymi TZO. Należy również podkreślić, że w wielu punktach referowane w niniejszej pracy doktorskiej badania przeprowadzone na uproszczonych modelach biomembran były zbieżne z wynikami uzyskanymi dla hodowli mikroorganizmów glebowych znanymi z literatury naukowej. Badania prowadzone na monowarstwach Langmuira są szybkie, stosunkowo proste i w wersji podstawowej nie wymagają bardzo kosztownej aparatury. Dlatego zdaniem autorki częściej powinny być wykorzystywane przy opracowywaniu skutecznych metod bioremediacji.