

БІОДЕГРАДАЦІЯ ПАРАЦЕТАМОЛУ НОКАРДІОПОДІБНИМИ АКТИНОБАКТЕРІЯМИ

Л.А. Хоменко, Т.М. Ногіна

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна
e-mail: homenkolud@ukr.net*

Мета роботи. Провести скринінг штамів актинобактерій, здатних до засвоєння парацетамолу (N-(4-гідроксіфеніл)ацетаміду) та вивчити особливості їх росту на вказаному субстраті. **Методи.** Роботу виконано з використанням класичних мікробіологічних, фізико-хімічних методів. Токсичну дію парацетамолу вивчали методом серійних розведень. Дослідження парацетамолу та продуктів його біотрансформації визначали двома методами – спектрометричним та тонкошарової хроматографії. **Результати.** Проведено дослідження здатності штамів актинобактерій до деструкції парацетамолу. У процесі біодеструкції парацетамолу (при початковому вмісті у середовищі 2 г/л) встановлено, що продуктами його окиснення штамами актинобактерій є *p*-амінофенол, пірокатехін, бензохінон, гідрохінон та муконова кислота, які відносяться до екологічно безпечних речовин і проявляють стимулюючий вплив на ріст та розвиток вищих рослин. Рівень деструкції парацетамолу за 5 діб росту найбільш активним штамом *Rhodococcus erythropolis* УКМ Ас-23 дорівнює 96,3%. **Висновки.** Здатність актинобактерій до деструкції парацетамолу свідчить про можливість їх використання у біотехнологіях очищення середовищ від речовин, що містять фенольний гідроксил.

Ключові слова: актинобактерії, парацетамол, біодеструкція, лікарські засоби.

Забруднення навколишнього середовища фармацевтичними препаратами вважається новою екологічною проблемою, що викликано постійним збільшенням об'ємів фармацевтичного ринку. На сьогоднішній день зареєстровано близько 4000 активних лікарських засобів у всьому світі, кількість яких щорічно зростає. В багатьох країнах виявлені лікарські засоби (ЛЗ) в поверхневих, морських, підземних та стічних водах очисних споруд, а також в питній воді. Потрапляння лікарських засобів у природне середовище може відбуватися на різних етапах його застосування, наприклад, виробництво та споживання, а також управління відходами (в результаті неправильної утилізації). Відомо, що найчастіше (80%) лікарських засобів (ЛЗ) з закінченим строком придатності населення викидає в загальні побутові відходи, та близько 15% змивають в каналізацію [1, 2, 3].

Фармацевтичний ринок України на сьогодні налічує близько 22 тисяч найменувань медичних препаратів, але точних даних про кількість підроблених і якісних ліків немає, на жаль, ні в одній країні світу. Згідно з даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) у країнах з нерозвиненою економікою відсоток фальсифікату становить половину всіх лікарських засобів, а в розвинених країнах – близько 10 % [4]. Проблема знешкодження (утилізації) непридатних для медичного використання лікарських засобів на сьогодні не вирішена у більшості країн світу.

Відповідно до закону України «Про відходи» від 05.03.1998 № 187/9 кожен виробник продукції повинен мати спосіб його утилізації або знищення, безпечний для довкілля та здоров'я, тобто фармацевтичні фірми повинні мати відповідні технології їх утилізації чи знищення [5, 6]. В Україні, на жаль, не існує єдиної системи знищення неякісних ліків та відсутні централізовані місця їх зберігання. Для знищення фармацевтичних відходів у більшості країн застосовують наступні методи: надання нетоварного вигляду з вивезенням на спеціальні санітарні звалища, інкапсуляції, інертизації, високотемпературного спалювання, розведення водою та злив до комунального колектора. Недоліком вказаних методів є те, що в результаті такої переробки можуть утворюватися екологічно шкідливі речовини [7].

Процес знешкодження непридатних до використання лікарських засобів регулюється наступними нормативними документами, які розроблені відповідно до Законів України: «Про лікарські засоби» (123/96-ВР), «Про забезпечення санітарного та епідемічного благополуччя населення» (4004-12), Положення про Державну службу лікарських засобів і виробів медичного призначення, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 2 червня 2003 року N 789 (789-2003-п) (зі змінами) [5–13]. У зв'язку з цим актуальним є пошук більш екологічно прийнятних способів знищення непридатних до використання лікарських засобів, в тому числі інноваційних технологій, заснованих на використанні ферментативної активності мікроорганізмів.

Як ефективні біодеструктори фармполітантів використовують актинобактерії, які широко розповсюджені в техногенно-забруднених середовищах [7, 14–19]. Ця група мікроорганізмів відома за їх здатністю розкладати ксенобіотики та володіти унікальною ферментною системою (дегідрогенази, пероксидази, оксигенази, алкілсульфатази, фенолгідролази, нітрілгідролази) [7], що свідчить про перспективність використання цієї групи мікроорганізмів при розробці біологічних засобів утилізації лікарських засобів.

Враховуючи наведене, метою роботи було провести скринінг штамів актинобактерій, здатних до засвоєння парацетамолу, та вивчити особливості їх росту на цьому субстраті.

Матеріали і методи. Об'єктами досліджень були 40 штамів нокардіоподібних актинобактерій (табл. 1.), які підтримуються в Українській колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України та належать до видів *Dietzia maris* (6 шт.), *Gordonia rubripertincta* (5 шт.), *Rhodococcus erythropolis* (17 шт.), *Rhodococcus fascians* (3 шт.), *Rhodococcus opacus* (4 шт.), *Rhodococcus ruber* (5 шт.). Пошук штамів-деструкторів парацетамолу проводили серед вуглеводнеокиснювальних штамів актинобактерій.

Первинний скринінг штамів-деструкторів парацетамолу проводили за результатами вимірювання оптичної густини культуральної рідини на спектрофотометрі після росту культур при температурі 28°C в умовах перемішування впродовж 7 діб на мінеральному середовищі RS, (г/л): NaCl – 1,0; KNO₃ – 1,0; MgSO₄ – 0,2; KH₂PO₄ – 1,0; K₂HPO₄ – 1,0; KNO₃ – 1,0; (NH₄)₂SO₄ – 2,0; FeCl₃ – 0,001; CaCl₂ – 0,02 [19]. Як джерело вуглецю

та енергії використовували парацетамол (N-(4-гідроксіфеніл)ацетамід) у вигляді фармацевтичної субстанції (ПрАТ «Фармацевтична фірма «Дарниця», Україна), яку вносили в середовище культивування до кінцевої концентрації 2 г/л. Інокулятом слугувала водна суспензія вирощених на МПА дводобових бактеріальних культур (титр клітин 10^8 кл/мл).

Таблиця 1

Досліджені штами нокардіоподібних актинобактерій

Назва виду	Кількість штамів	Джерело виділення
<i>Dietzia maris</i>	6	Ґрунт, забруднений оливами, м.Чернігів та смт. Пуша-Водиця
<i>Gordonia rubripertincta</i>	5	Ґрунт, Україна
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	17	Ґрунт, забруднений нафтою, метилбензилом, ґрунт біля бензоколонки, активний мул міських очисних споруд, смт.Бортничі
<i>Rhodococcus fascians</i>	3	Ґрунт, забруднений нафтопродуктами, нафтосклад, м. Полтава
<i>Rhodococcus opacus</i>	4	Ґрунт, Україна
<i>Rhodococcus ruber</i>	5	Ґрунт, забруднений нафтопродуктами, нафтосклад, м. Полтава, вода з р. Дніпро, м. Київ

Токсичну дію парацетамолу (N-(4-гідроксіфеніл)ацетаміду) по відношенню до штамів актинобактерій вивчали методом серійних розведень цієї речовини в рідкому поживному середовищі RS. Парацетамол (N-(4-гідроксіфеніл)ацетамід) використовували у наступних концентраціях, (г/л): 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,0; 6,5; 10,0 та 12,0. Результати враховували через 48 годин культивування за наявністю видимого росту актинобактерій. Концентрацію речовини в останній пробірці ряду без видимого росту вважали за мінімальну пригнічувальну концентрацію (МПК). Контролем слугували пробірки з різним вмістом парацетамолу без мікроорганізмів, а також пробірки з мінеральним середовищем без цієї сполуки, але з мікроорганізмами [20].

Дослідження парацетамолу (N-(4-гідроксіфеніл)ацетаміду) та продуктів його біотрансформації визначали двома методами – спектрометричним та тонкошаровою хроматографією. Для отримання кількісних характеристик процесу біодеструкції парацетамолу використовували реакцію конденсації п-амінофенолу (первинного метаболіту) з п-диметиламінобензальдегідом. Для цього в мірну колбу об'ємом 25 мл додавали 3 мл культуральної рідини (після росту штамів на середовищі RS з парацетамолом, 2 мл 0,1 моль/л розчину HCl, 5 мл спирту етилового 95 % та 10 мл 5% спиртового розчину п-диметиламіно-бензальдегіду. Об'єм розчину доводили дистильованою водою до мітки та перемішували. Оптичну густину отриманого розчину вимірювали через 15 хвилин на спектрофотометрі СФ-26 при довжині хвилі 450 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм. Як контроль використовували мінеральне середовище без мікроорганізмів, яке готували за вищенаведеною методикою.

Розрахунок складу *p*-амінофенолу (X) в культуральній рідині у % від взятої наважки парацетамолу (N-(4-гідроксіфеніл)ацетаміду) проводили за формулою [17]:

$$X = D_1 \cdot a_0 \cdot V_2 / D_0 \cdot a_1 \cdot V_1;$$

де: D_1 – оптична густина досліджуваного розчину;

D_0 – оптична густина контрольного розчину *p*-амінофенолу;

a_1 – наважка парацетамолу (N-(4-гідроксіфеніл)ацетаміду) в досліджуваному розчині, г;

a_0 – наважка *p*-амінофенолу в контрольному розчині, г;

V_1 – об'єм культуральної рідини, яку взяли для аналізу, мл;

V_2 – загальний об'єм культуральної рідини, мл.

Методом тонкошарової хроматографії проводили якісне дослідження продуктів біотрансформації парацетамолу (N-(4-гідроксіфеніл)ацетаміду) на пластинках «Silufol». Як рухомі фази були досліджені 10 систем (табл. 2) [17, 21]. Контролем слугувала модельна суміш продуктів біодеструкції ацетамінофену: *p*-амінофенол, гідрохінон, пірокатехін, бензохінон («Sigma – Aldrich»). Розділення проводили при кімнатній температурі (близько 20°C), висушували та ідентифікували парами йоду впродовж 10 хв або в УФ-області при 254 нм.

Таблиця 2

Системи, які використовували для дослідження продуктів деструкції парацетамолу методом тонкошарової хроматографії

№	Рухома фаза	Співвідношення розчинників
1	Хлороформ – спирт етиловий	8:2
2	Хлороформ – спирт етиловий	7:3
3	Хлороформ – спирт етиловий-оцтова кислота	9:1:0,1
4	Хлороформ – ацетон	9:1
5	Хлороформ – спирт етиловий – оцтова кислота	7:3:0,2
6	Хлороформ – спирт етиловий – оцтова кислота	5:5:0,2
7	Хлороформ – метанол – оцтова кислота	9:1:0,1
8	Толуол	
9	Толуол – спирт етиловий	7:3
10	Толуол – спирт етиловий – оцтова кислота	7:3:0,1

Визначення фітотоксичності парацетамолу (N-(4-гідроксіфеніл)ацетаміду) та продуктів його біотрансформації проводили, як описано у роботі Пименової Е.В. із співавторами [22]. Для оцінки токсичності як тест-об'єкт використовували насіння озимої пшениці сорту Зира (*Triticum aestivum*). Фітотоксичність середовища з парацетамолом до та після культивування штамів оцінювали за морфо-фізіологічними характеристиками проростків (довжина стебла, довжина кореня, суха маса). У чашки Петрі поміщали стерильний фільтрувальний папір, оброблений 10 мл 2 г/л розчину парацетамолу та культуральною рідиною після росту штамів на цій речовині та викладали рівномірно 25 насінин пшениці. Контролем було насіння, пророщене в дистильованій воді. Експерименти проводили при температурі 25 – 28 °C впродовж 5 – 7 діб, після чого підраховували кількість проростків, вимірювали довжину стебла і кореня та суху масу.

Статистика. Результати досліджень обробляли статистичними методами за допомогою пакета програмних засобів Microsoft Excel. В таблицях наведені середні значення, які були достовірні при $p \leq 0,05$.

Результати. Первинний скринінг штамів актинобактерій, здатних до біотрансформації парацетамолу, визначали за появою темного забарвлення культуральної рідини після росту штамів на середовищі з цією речовиною як єдиним джерелом вуглецю та енергії. Це свідчило про окиснення (трансформацію) цієї речовини до п-амінофенолу, розчини якого мають колір від темно-коричневого до чорного (рис. 1).

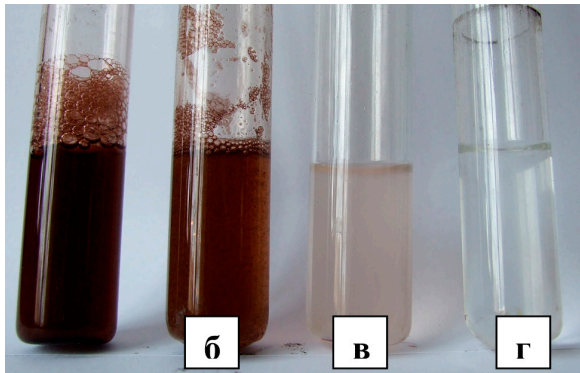


Рис.1. Ріст штамів *R. erythropolis* УКМ Ас-50 (а), *G. rubripertincta* УКМ Ас-179 (б) та *D. maris* УКМ Ас-223 (в) на середовищі з 2 г/л парацетамолу через 24 години, контроль – середовище з 2 г/л парацетамолу (г)

Встановлено, що найбільша кількість штамів, які засвоюють парацетамол, належала до видів *R. erythropolis* і *R. ruber* (100 % від досліджених) (рис. 2.). Значно менша кількість деструкторів цієї речовини виявлена серед штамів *G. rubripertincta* (40 %), *D. maris* (17%) та *R. opacus* (25 %). Жоден із представників виду *R. fascians* не ріс на середовищі з парацетамолом.

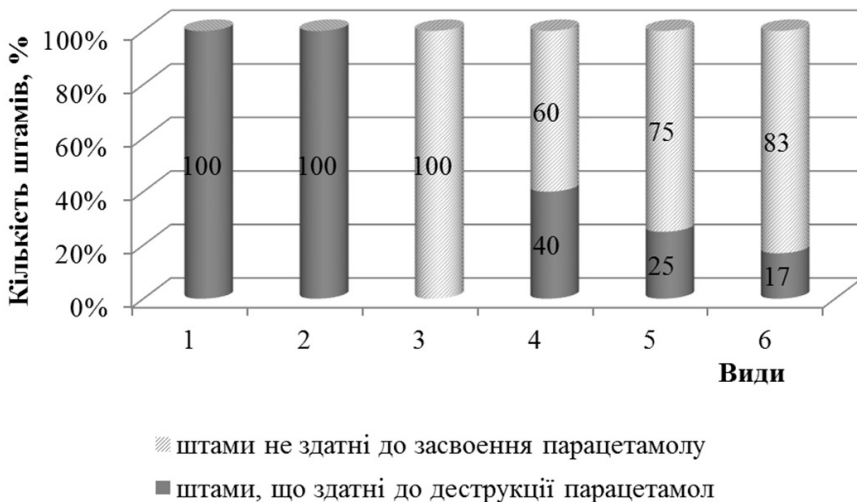


Рис. 2. Здатність штамів нокардіоподібних актинобактерій до росту на середовищі з парацетамолом (N-(4-гідроксифеніл)ацетамідом) . 1 – *R. erythropolis*, 2 – *R. ruber*, 3 – *G. rubripertincta*, 4 – *R. opacus*, 5 – *D. maris*, 6 – *R. fascians*

Визначення токсичної дії парацетамолу щодо штамів актинобактерій показало, що для більшості з них мінімальна пригнічувальна концентрація (МПК) (рис. 3) становила 10 г/л. Лише для трьох штамів *R. erythropolis* (УКМ Ас-58, УКМ Ас-73, УКМ Ас-55) МПК дорівнювала 6,5 г/л.

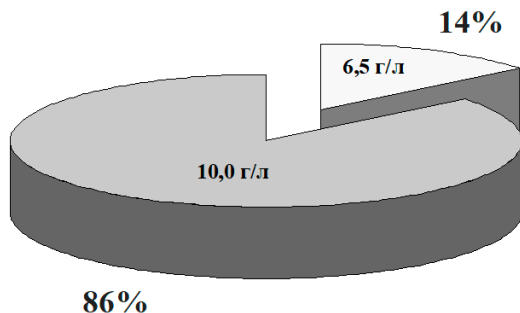


Рис.3. Мінімальна пригнічувальна концентрація парацетамолу щодо досліджених штамів актинобактерій

Для отримання кількісних характеристик процесу біодеструкції N-(4-гідроксіфеніл)ацетаміду нами вивчена можливість оцінки динаміки її змін за кількістю накопичення в середовищі первинного метаболіту – п-амінофенолу (рис. 4.).

Встановлено, що при рості більшості штамів на середовищі з парацетамолом найбільша концентрація п-амінофенолу 12 – 35 % спостерігалась на 3 добу, а на 5-у добу відбувалось зниження кількості цього метаболіту до 10 – 23 %. У деяких штамів (*R. erythropolis*) спостерігали збільшення кількості п-амінофенолу лише на 5-ту добу, що свідчить про більш низьку деструктивну активність цих штамів щодо ацетамінофену. На основі проведених досліджень нами були відібрані 3 штами, а саме: *R. erythropolis* УКМ Ас-23, УКМ Ас-51, УКМ Ас-77, як найбільш активні деструктори ацетамінофену, при культивуванні яких на 3 добу концентрація п-амінофенолу в середовищі дорівнювала 28 – 35 %.

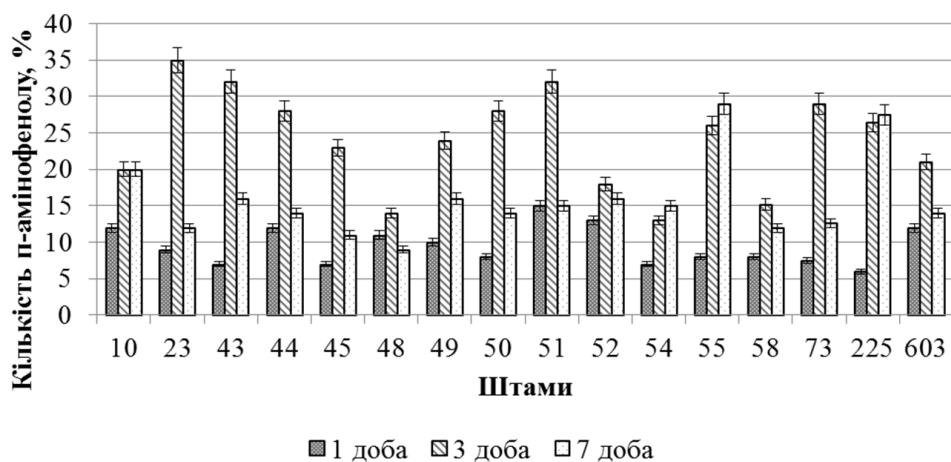


Рис. 4. Динаміка зміни кількості п-амінофенолу за умов росту актинобактерій на середовищі з парацетамолом

Якісне дослідження продуктів біодеструкції парацетамолу – п-амінофенолу, пірокатехіну, гідрохінону, бензохінону та муконової кислоти, проводили методом тонкошарової хроматографії на пластинках «Silufol» з використанням як рухомих фаз 10 систем (табл. 3). Досліджувані речовини не визначались при використанні рухомих фаз I, III, IV, VI. А при застосуванні системи II визначали лише п-амінофенол. При використанні елюентів V, VII, VIII, IX близькі значення R_f не дозволяли розділити досліджувані речовини, які з'являються у культуральній рідині при деструкції парацетамолу.

Таблиця 3
Значення R_f досліджуваних речовин в різних системах

Сполуки	Рухома фаза									
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
парацетамол	0	0	0	0	0,14/0,75	0	0	0	0	0,33
п-амінофенол	0	0,42	0	0	0	0	0,19	0	0,4/0,8/0,86	0,1
гідрохінон	0	0	0	0	0,76	0	0,88	0	0,61/0,88	0,56
бензохінон	0	0	0	0	0	0	0	0,35	0,69	0,38
пірокатехін	0	0	0	0	0,79	0	0,89	0,22	0,62/0,73/0,93	0,63
муконова кислота	0	0	0	0	0	0	0	0	0,87/0,78	0,78

Примітка: значення R_f – середній результат з трьох досліджень на пластинках «Silufol».

Для ефективного розділення суміші досліджуваних речовин нами була підбрана, як найбільш оптимальна, рухома фаза: спирт етиловий – толуол – оцтова кислота (3:7:0,2) та визначені R_f досліджуваних речовин. Результати тонкошарового розділення цих сполук в різних розчинниках (системах) наведені в таблиці 3.

При використанні рухомої фази спирт етиловий – толуол – оцтова кислота (3:7:0,2) встановлена присутність продуктів деструкції парацетамолу в культуральній рідині актинобактерій до та після їх росту на середовищі з цією сполукою. При деструкції парацетамолу впродовж 12–24 годин росту з'являється перший метаболіт – п-амінофенол, через 48 годин – пірокатехін та гідрохінон, а через 72 години – бензохінон та муконова кислота.

З огляду на те, що речовини, які входять до складу лікарських засобів та деякі продукти їх метаболізму, є токсичними, була досліджена фітотоксичність парацетамолу (N-(4гідроксіфеніл)ацетаміду) та культуральної рідини, що містить кінцеві продукти його біодеструкції після культивування штаму *R. erythropolis* УКМ Ас-23, на ріст тест-рослини пшениці сорту Зира шляхом обробки насіння цими розчинами (табл.4).

Таблиця 4
Фітотоксичність парацетамолу та культуральної рідини після росту штаму *R. erythropolis* УКМ Ас-23 на середовищі з цією сполукою

Показник росту, % до контролю	Парацетамол	Культуральна рідина штаму <i>R. erythropolis</i> УКМ Ас-23
Кількість насіння, що проросло	71,4	104,8
Довжина стебла	67,2	134,9
Довжина кореня	26	133,4
Біомаса суха	58,6	111,8

Встановлено, що розчин парацетамолу (з концентрацією 2 г/л) проявляв інгібуючу дію на проростання насіння на 28,6 % у порівнянні з контролем (табл. 4, рис. 5). На відміну від цього при обробці насіння розчином, що містить кінцеві продукти деструкції ацетамінофену, спостерігався стимулюючий вплив цього розчину на схожість та біометричні показники проростків пшениці. Так, довжина кореня та стебла збільшувалась на 33 %, а кількість сухої біомаси – на 12 %.

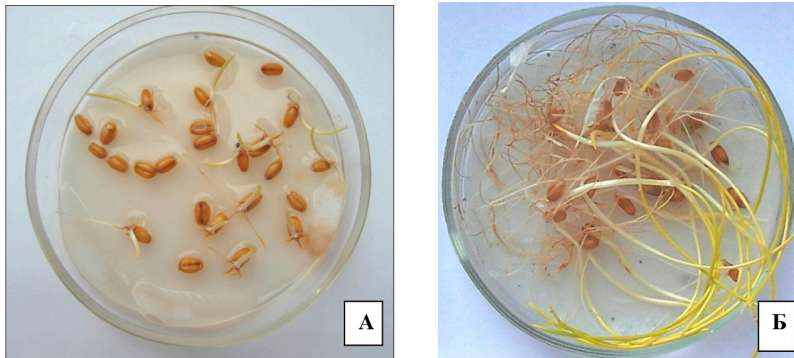


Рис. 5. Проростки пшениці сорту Зира після обробки насіння розчином парацетамолу (2 г/л) (А) та культуральною рідиною після росту штаму *R. erythropolis* УКМ Ас-23 на середовищі з 2 г/л парацетамолу (Б)

Обговорення. Види роду *Rhodococcus* можна назвати екологічними організмами, які відомі своєю здатністю до деструкції ароматичних сполук, що є потенційними забруднювачами навколишнього середовища. Адаптивність та широкий катаболічний потенціал нокардіоподібних актинобактерій до різних органічних сполук робить їх універсальними мікроорганізмами – деструкторами широкого спектру органічних речовин, до яких відносять фармполітанти.

Найбільш широко серед ЛЗ, які визначаються в питній воді, ґрунтових водах та водоймищах, зустрічаються забруднення парацетамолом [23]. Для очищення забруднених парацетамолом середовищ найбільш широко використовуються мікроорганізми роду *Pseudomonas* (як окремі активні штами-деструктори [24], так і в складі консорціумів [25, 26]). Існують поодинокі роботи, в яких використовували актинобактерії роду *Rhodococcus* [7, 14, 22–25, 27, 28, 29].

Первинний скринінг серед нокардіоподібних актинобактерій проводили за появою темного забарвлення (від темно-коричневого до чорного кольору) культуральної рідини після росту штамів на середовищі з парацетамолом як єдиним джерелом вуглецю та енергії. Іншими авторами для відбору штамів також був застосований цей швидкий якісний метод [26]. Встановлено, що найбільша кількість штамів-деструкторів парацетамолу належала до виду *R. erythropolis*, *R. ruber* (100% досліджених). Значно менша кількість деструкторів цієї речовини виявлена серед штамів *G. rubripertincta* (40 %), *D. maris* (17 %) та *R. opacus* (25 %). Слід зазначити, що за даними Івшиної зі співавторами серед 6 досліджених видів цього роду до деструкції парацетамолу були здатні тільки окремі штами видів *R. erythropolis* та *R. ruber*[14].

Визначення токсичної дії парацетамолу щодо штамів актинобактерій показало, що для більшості з них МПК парацетамолу становила 6,5 – 10 г/л. Слід підкреслити, що досліджені нами штами актинобактерій проявляли значно більшу стійкість до ацетамінофену порівняно з описаними в літературі даними для штамів роду *Rhodococcus*, у яких цей показник був в 2–4 рази менший та становив лише 2,5 – 5,0 г/л [17].

Найбільш активним штамом-деструктором парацетамолу є штам *Rhodococcus erythropolis* УКМ Ас-23, який за 72 години культивування проводив деструкцію цієї речовини до 96,3 % при його початковому вмісті 2 г/л. В той час як в дослідженнях Yun MA. et al встановлена 96% деструкція 1,5 г/л парацетамолу за 12 годин [30]. Hu et al. [31] показали, що парацетамол (1,2 г/л) повністю утилізується штамом *P. aeruginosa* HJ1012 за 48 годин. Штами *P. aeruginosa* STB2 і STB4 проводять повну деструкцію парацетамолу в концентраціях 2,0 і 2,5 г/л за 72 години [30]. При концентрації 4,0 г/л деструкція зменшилась и становила 54,62 – 77,4% за 120 годин [26].

Для отримання кількісних характеристик процесу біодеструкції парацетамолу вивчена можливість оцінки динаміки її змін за кількістю накопичення в середовищі первинного метаболіту – п-амінофенолу. При рості активних штамів-деструкторів парацетамолу найбільша концентрація п-амінофенолу становила 28 – 35 % на 3 добу росту. Отримані результати узгоджуються з даними інших авторів про біодеструкцію парацетамолу штамом *R. ruber*, при культивуванні якого максимальна кількість п-амінофенолу спостерігалась на 3 добу і досягала 36 % [14].

За літературними даними мікробна деструкція та трансформація парацетамолу відбувається за принципом розкладання ароматичних сполук та складається з гідроксилування та розщеплення ароматичного кільця. В результаті гідроксилування утворюються такі основні проміжні метаболіти, як катехін, протокатехінова кислота, гідроксихінол чи гентизинова кислота. Після цього відбувається 2 етап – розщеплення ароматичного кільця за рахунок впливу ферментів діоксигеназ [3, 23].

При використанні рухомої фази спирт етиловий – толуол – оцтова кислота (3:7:0,2) були вивчені продукти деструкції парацетамолу в культуральній рідині актинобактерій до та після їх росту на середовищі з цієї сполукою. В результаті проведених досліджень встановлена присутність таких продуктів деструкції, як п-амінофенол, пірокатехін, гідрохінон та бензохінон, муконова кислота. Івшина зі співавторами показала, що в процесі розпаду парацетамолу визначаються три метаболіти: 4-амінофенол, катехол та гідрохінон [16].

Крім того, Акау and Tezel [29] встановили, що штами *R. erythropolis* можуть перетворювати парацетамол у фенольні сполуки та органічні кислоти за рахунок низки реакцій гідроксилування. В результаті біотрансформації парацетамолу спочатку утворюється 4-амінофенол, який потім перетворюється у гідрохінон шляхом заміщення аміногрупи гідроксилем.

На основі отриманих експериментальних результатів та літературних даних [17, 23] біодеструкцію парацетамолу досліджуваними штамми актинобактерій можна представити наступною схемою (рис. 5.).

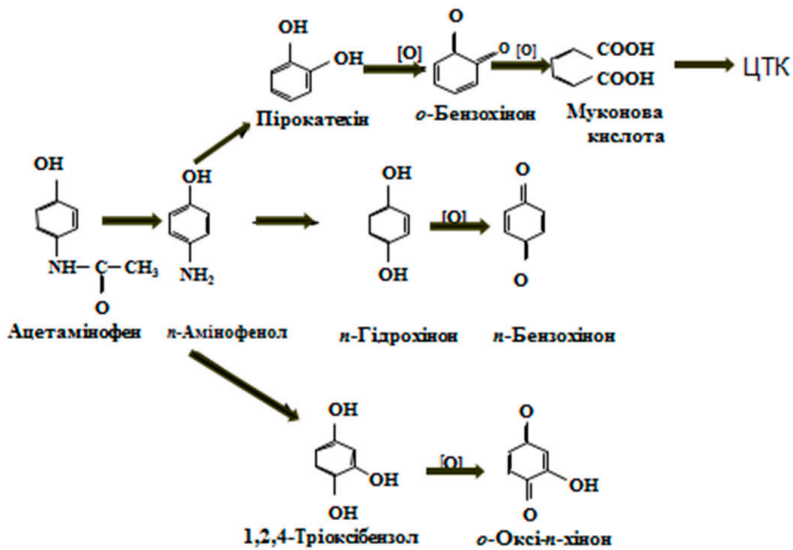


Рис 6. Схема біодеструкції ацетамінофену [17]

Встановлено, що в процесі деструкції парацетамолу утворюється гідрофобний, темно-коричневий осад, який, за даними літератури, набуває такого кольору за рахунок присутності фенольних та хіноїдних сполук [28].

Коротаєв М.Ю. методами ^{13}C ЯМР-спектроскопії і хромато-мас-спектрометрії дослідив, що до складу цього осаду входять похідні індолу та бензофурану [27]. При обробці насіння пшениці сорту Зира розчином, що містить кінцеві продукти деструкції парацетамолу після культивування штаму *R. erythropolis* УКМ Ас-23, спостерігався стимулюючий вплив цього розчину на схожість та біометричні показники проростків пшениці. Так, довжина кореня та стебла збільшувалась на 33 %, а кількість сухої біомаси – на 12 %. Таким чином, проведені дослідження свідчать про те, що отримана після закінчення процесу біодеструкції парацетамолу культуральна рідина не тільки не є токсичною для рослин, але й позитивно впливає на них.

Це можна пояснити на прикладі штаму *R. ruber* ІЕГМ 77 утворенням в результаті біологічної біотрансформації парацетамолу амінофенольних, феноксазинових, індольних та бензофуранових фрагментів, які мають гуміноподібну природу, що в подальшому призводить до ферментативної меланізації поліамінофенолів [27].

Отримані експериментальні дані можуть бути використані при розробці біотехнологій утилізації лікарських засобів – фальсифікованих, бракованих чи із закінченим строком придатності, а також у біотехнологіях очищення середовищ від речовин, що містять фенольний гідроксил.

БИОДЕГРАДАЦИЯ ПАРАЦЕТАМОЛА НОКАРДИОПОДОБНЫМИ АКТИНОБАКТЕРИЯМИ

Л.А. Хоменко, Т.М. Ногина

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина*

Резюме

Цель работы. Провести скрининг штаммов актинобактерий, способных к усвоению парацетамола (N-(4-гидроксифенил)ацетамида) и изучить особенности их роста на указанном субстрате. **Методы.** Работа выполнена с использованием классических микробиологических, физико-химических методов. Токсическое действие парацетамола изучали методом серийных разведений. Исследование парацетамола и продуктов его биотрансформации определяли двумя методами – спектрометрическим и тонкослойной хроматографии. **Результаты.** Проведено исследование способности штаммов актинобактерий к деструкции парацетамола. В процессе биодеструкции парацетамола (при начальном содержании в среде 2 г/л) штаммами актинобактерий установлено, что продуктами его окисления является *p*-аминофенол, пирокатехин, бензохинон, гидрохинон и муконовая кислота, которые относятся к экологически безопасным веществам и проявляют стимулирующее влияние на рост и развитие высших растений. Уровень деструкции парацетамола за 5 суток роста у наиболее активного штамма *Rhodococcus erythropolis* УКМ Ас-23 равен 96,3%. **Выводы.** Способность актинобактерий к деструкции парацетамола свидетельствует о возможности их использования в биотехнологиях очистки сред от веществ, содержащих фенольный гидроксил.

Ключевые слова: актинобактерии, парацетамол, биодеструкция, лекарственные средства.

BIODEGRADATION OF PARACETOMOL BY NOCARDIOFORM ACTINOBACTERIA

Khomenko L.A., Nogina T.M.

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,
154 Acad Zabolotny Str, Kyiv, 03143, Ukraine*

Summary

The aim of the work was to study paracetamol-degrading ability of actinobacteria and their growth using it as a substrate screen the strains of actinobacteria capable of dergrading paracetamol (N-(4-hydroxyphenyl)acetamide) and to study the characteristics of their growth on this indicated substrate. **Methods.** The work was performed using classical microbiological, physicochemical methods. The toxic effect of paracetamol was studied by serial dilution method. The concentration of paracetamol and its biotransformation products was determined by two methods - spectrometry and thin layer chromatography. **Results.** The ability of actinobacteria strains to biodegrade paracetamol has been studied. At the initial concentration of acetaminophen at 2 g/l actinobacteria have been shown to oxidize the drug in the medium to *p*-aminophenol, pyrocatechin, benzoquinone, hydroquinone and muconic acid, which are eco-friendly (non-toxic) compounds that exhibit positive effect on the growth and development of higher plants. After 5 days of cultivation the

highest biodegradation activity of paracetamol (96.3%) was demonstrated by the strain *Rhodococcus erythropolis* UCM Ac-23. **Conclusions.** The ability of actinobacteria to degrade acetaminophen indicates their potential for bioremediation of phenolic hydroxyl-contaminated media.

Keywords: actinobacteria, paracetamol, biodegradation, drugs.

1. Proslanik LF, Tsubanova NA, Piminov AF, Evseeva LV. Ekopatologii cheloveka v aspekte farmatsevticheskogo zagriazneniia. Farmatsevtichna nauka ta praktyka: problemy, dosiahnenniia, perspektyvy rozvytku: materialy I nauk.-prakt. internet-konf. z mizhnar. Uchastiu. (Kharkiv, 24–25 bereznia, 2016) Kharkiv. 2016; 295–296. Ukrainian.
2. Felicity T. Farmatsevticheskie otkhody v okruzhaiushchei srede: vzgliad s pozitsii kultury. Panorama obshchestvennogo zdravookhraneniia. 2017; 3(1):133–139. Russian.
3. Žur J, Piński A, Marchlewicz A, Hupert-Kocurek K, Wojcieszynska D, Guzik U. Organic micropollutants paracetamol and ibuprofen - toxicity, biodegradation, and genetic background of their utilization by bacteria. Environmental science and pollution research international. 2018; 25:21498–21524. DOI.ORG/10.1007/s11356-018-2517-x.
4. Farmrynok Ukrainy: realnist i perspektyvy 2013. Novyny. Biznes vid 18 bereznia 2013. <http://vkurse.ua/ua/business/realnost-i-perspektyvy.html>.
5. Ostanina NV, Kuznetsova EM, Ochertianaia NN, Klimenko EV. Problemy, sviazannye s unichtozheniem nekachestvennykh lekarstvennykh preparatov v Ukraine. Elektronnaia versiia materialov 1-oi Mezhdunarodnoi konferentsii «Sotrudnichestvo dlia resheniia problemy otkhodov» <http://waste.com.ua/cooperation/2004/thesis/ostanina.html>.
6. Zakon Ukrainy “Pro vidkhody” vid 05.03.1998 # 187/98-VR. Ukrainian.
7. Krivoruchko A, Kuyukina M, Ivshina I. Advanced *Rhodococcus* biocatalysts for environmental biotechnologies. Review. Catalysts. 2019; 9:236–255. DOI:10.3390/catal9030236.
8. Zakon Ukrainy “Pro zahalnodержavnu prohramu povodzhennia z toksychnymy vidkhodamy” vid 14.09.2000 № 1947-III. Ukrainian.
9. NAKAZ 08.07.2004 N 349, Zareiestrovano v Ministerstvi yustytsii Ukrainy 23 lypnia 2004 r. za N 916/9515 Pro zatverdzhennia Pravyly provedenniia utylizatsii ta znyshchennia neiakysnykh likarskykh zasobiv (Iz zminamy, vnesenymy zghidno z Nakazom Ministerstva okhorony zdorovia N 55 (z0138-07) vid 05.02.2007. Ukrainian.
10. Zakon Ukrainy «Pro likarski zasoby» (№ 123/96-VR). Ukrainian.
11. Postanova Kabinetu Ministriv Ukrainy vid 2 chervnia 2003 roku N 789 (789-2003-p) «Pro utvorennia Derzhavnoi sluzhby likarskykh zasobiv i vyrobiv medychnoho pryznachennia» (zi zminamy). Ukrainian.
12. Pravyla rozrobleni vidpovidno do Zakoniv Ukrainy «Pro likarski zasoby» (№ 123/96-VR), «Pro zabezpechennia sanitarnoho ta epidemichnoho blahopoluchchia naselennia» (№ 4004-12). Ukrainian.
13. Polozhennia pro Derzhavnu sluzhbu likarskykh zasobiv i vyrobiv medychnoho pryznachennia, zatverdzenoho postanovoiu Kabinetu Ministriv Ukrainy vid 2 chervnia 2003 roku № 789 (789-2003-p) (zi zminamy). Ukrainian.
14. Ivshina IB, Rychkova MI, Vikhareva EV, Chekryshkina LA, Mishenina II. Alkanotrofnye rodokokki kak katalizatory protsessa biodestruktsii neprigodnykh k ispolzovaniiu lekarstvennykh sredstv. Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia. 2006; 42 (4):443 – 447. Russian.

15. Larkin MJ, Kulakov LA, Allen CCR. Biodegradation and *Rhodococcus*- masters of catabolic. Current Option in Biotechnonology. 2005; 16:282–290.
16. Ivshina IB, Rychkova MI, Vikhareva EV. et al. Catalysis of the biodegradation of unusable medicines by Alkanotrophic rhodococci. Applied Biochemistry and Microbiology. 2006; 42(4):392–395. DOI.ORG/10.1134/S0003683806040090.
17. Mishenina II. Razrabotka biologicheskogo sposoba utilizatsii neprigodnykh k meditsinskomu ispolzovaniuu lekarstvennykh sredstv, proizvodnykh fenola. Avtoref. dis. ... kand. farm. nauk. Perm. 2008: 20. Russian.
18. Ivshina I, Tyumina E, Vikhareva E. Biodegradation of emerging pollutants: Focus on pharmaceuticals. Microbiol. Aust. 2018; 39:117–122.
19. Vikhareva EV, Chekryshkina LA, Mishenina II, Soloninina AV, Ivshina IB, Rychkova MI. Izuchenie biodestruktsii paratsetamola aktinobakteriiami roda rodokokki. Farmatsevticheskaiia khimiiia i farmakognoziia. 2004:12–13. Russian.
20. Egorov NS. Osnovy ucheniia ob antibiotikakh. M: Vysshiaia shkola, 1986: 447. Russian.
21. Sharma OP; Bhat TK and Singh B. Thinlayer chromatography of gallic acid, methyl gallate, pyrogallol, phloroglucinol, catechol, resorcinol, hydroquinone, catechin, epicatechin, cinnamic acid, p-coumaric acid, ferulic acid and tannic acid. Journal of Chromatography. 1998; 822:167–171.
22. Pimenova EV, Kozlova GA, Burkova MV. Otsenka mikrobnoi detoksikatsii gerbetsida tornado na osnove glifosata metodom fitotesterovaniia. Vestnik Permskogo natsionalnogo issledovatel'skogo politekhnicheskogo universiteta. Khimicheskaiia tekhnologiia i biotekhnologiia. 2011; 12:160–164. Russian.
23. AL-Kaf GA, Naji KM, Abdullah QY, Edrees WH. Occurrence of paracetamol in aquatic environments and transformation by microorganisms: A Review. Chronicles of Pharmaceutical Science. 2017; 1(6):341–355.
24. De Gusseme B, Vanhaecke L, Verstraete W, Boon N. Degradation of acetaminophen by *Delftia tsuruhatensis* and *Pseudomonas aeruginosa* in a membrane bioreactor. Water Res. 2011; 45(4):1829–1837. doi: 10.1016/j.watres.2010.11.040.
25. Zhang L, Hu J, Zhu R, Zhou Q, Chen J. Degradation of paracetamol by pure bacterial cultures and their microbial consortium. Applied Microbiology and Biotechnology. 2013; 97(8):3687–3698. doi: 10.1007/s00253-012-4170-5.
26. Abdullah QY, Edrees WH, AL-Kaf GA, Naji KM. Biodegradation of paracetamol by native bacterial strains isolated from yemeni pharmaceutical wastewater plant in Sana'a. Chronicles of Pharmaceutical Science. 2018; 2(2):512–522.
27. Korotaev MIu, Vikhareva EV, Ivshina IB. Melanizatsiia poliaminofenolov v protsesse biotransformatsii paratsetamola kletkami *Rhodococcus ruber* IEGM 77. Vestnik Permskogo universiteta. Seriiia «Biologiia». 2016; 2:166–170. Russian.
28. Korotaev MIu, Rychkova MI, Vikhareva EV, Ivshina IB. Opredelenie srednei molekuliarnoi massy nerastvorimykh produktov biodestruktsii paratsetamola kletkami *Rhodococcus ruber* IEGM 77. Fundamentalnye issledovaniia. 2015, 2(26):5850–5854. Russian. <http://www.fundamentalresearch.ru/ru/article/view?id=38517>
29. Akay C, Tezel U. Biotransformation of acetaminophen by four phylogenetically distinct bacteria. Proceedings CRETE 2016, Fifth International Conference on Industrial and Hazardous Waste Management. Chania–Crete–Greece. 2016: 27–30.

30. Yun MA, et al. Isolation and characterization of a acetaminophen degrading bacterium. Journal of Zhejiang University of Technology. 2013: 35–38.
31. Hu J, Zhang LL, Chen JM, Liu Y. Degradation of paracetamol by *Pseudomonas aeruginosa* strain HJ1012. Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering. 2013; 48(7):791–9.

Отримано 27.03.2019