Određivanje potencijalnog bioremedijacijskog učinka enzima lakaze putem umu-testa

Juršić, Lara

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Pula / Sveučilište Jurja Dobrile u Puli**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:137:579927

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Image not found or type unknown

Repository / Repozitorij:

Digital Repository Juraj Dobrila University of Pula

zir.nsk.hr

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE JURJA DOBRILE U PULI
PREDDIPLOMSKI STUDIJ ZNANOST O MORU

Lara Juršić

Određivanje potencijalnog bioremedijacijskog učinka enzima lakaze putem umu-testa

ZAVRŠNI RAD

Rovinj, 2016. godine

SVEUČILIŠTE JURJA DOBRILE U PULI
PREDDIPLOMSKI STUDIJ ZNANOST O MORU

LARA JURŠIĆ

Određivanje potencijalnog bioremedijacijskog učinka enzima lakaze putem umu-testa

ZAVRŠNI RAD

JMBAG: 0303046463, redovita studentica
Studijski smjer: Znanost o moru
Predmet: Biotestovi i biološki monitoring zagađivala
Mentor: Izv. prof. dr. sc. Bojan Hamer

Rovinj, rujan, 2016. godine

IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, dolje potpisana Lara Juršić, kandidatkinja za prvostupnika (baccalaureus) znanosti o moru ovime izjavljujem da je ovaj Završni rad rezultat isključivo mojega vlastitog rada, da se temelji na mojim istraživanjima te da se oslanja na objavljenu literaturu kao što to pokazuju korištene bilješke i bibliografija. Izjavljujem da niti jedan dio Završnog rada nije napisan na nedozvoljen način, odnosno da je prepisan iz kojega necitiranog rada, te da ikoji dio rada krši bilo čija autorska prava. Izjavljujem, također, da nijedan dio rada nije iskorišten za koji drugi rad pri bilo kojoj drugoj visokoškolskoj, znanstvenoj ili radnoj ustanovi.

Student

_____

U Rovinju, 14. rujna 2016.

IZJAVA

o korištenju autorskog djela

Ja, Lara Juršić, dajem odobrenje Sveučilištu Jurja Dobrile u Puli, kao nositelju prava iskorištavanja, da moj završni rad pod nazivom Određivanje potencijalnog bioremedijacijskog učinka enzima lakaze putem umu-testa koristi na način da gore navedeno autorsko djelo, kao cjeloviti tekst trajno objavi u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli te kopira u javnu internetsku bazu završnih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice (stavljanje na raspolaganje javnosti), sve u skladu s Zakonom o autorskom pravu i drugim srodnim pravima i dobrom akademskom praksom, a radi promicanja otvorenoga, slobodnoga pristupa znanstvenim informacijama.

Za korištenje autorskog djela na gore navedeni način ne potražujem naknadu.

U Rovinju, 14. rujna 2016.

Potpis

_____

Ovaj rad, izrađen u Centru za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković u Rovinju, pod vodstvom dr. sc. Bojana Hamera, predan je na ocjenu preddiplomskom studiju Znanost o moru Sveučilišta u Puli radi stjecanja zvanja prvostupnik (Baccalaureus) znanosti o moru.

Voditelj Sveučilišnog preddiplomskog studija Znanost o moru je za mentora završnog rada imenovao dr.sc. Bojana Hamera.

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Bojan Hamer

Povjerenstvo za ocjenjivanje i obranu:

Predsjednik: Doc. dr. sc. Dijana Pavičić-Hamer

Institut Ruđer Bošković, Centar za istraživanje mora, Rovinj

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Bojan Hamer

Institut Ruđer Bošković, Centar za istraživanje mora, Rovinj

Član: Dr. sc. Ines Kovačić

Juraj Dobrila Sveučilište u Puli, Pula

Datum i mjesto obrane završnog rada:

14. rujna 2016., Rovinj

Rad je rezultat samostalnog istraživačkog rada.

Lara Juršić _____

ZAHVALA

Završni rad sam izradila u Centru za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković u Rovinju.

Ovim putem se zahvaljujem svojem mentoru dr. sc. Bojanu Hameru koji mi je svojim stručnim vodstvom i pristupom omogućio izradu ovog rada. Zahvaljujem mu na pomoći i strpljivosti tijekom laboratorijskog rada te iznimnoj pristupačnosti u svakom trenutku tijekom pisanja završnog rada.

Zahvaljujem se svojoj obitelji i Danielu Zgrabliću na podršci i strpljenju tijekom godina studiranja.

SADRŽAJ

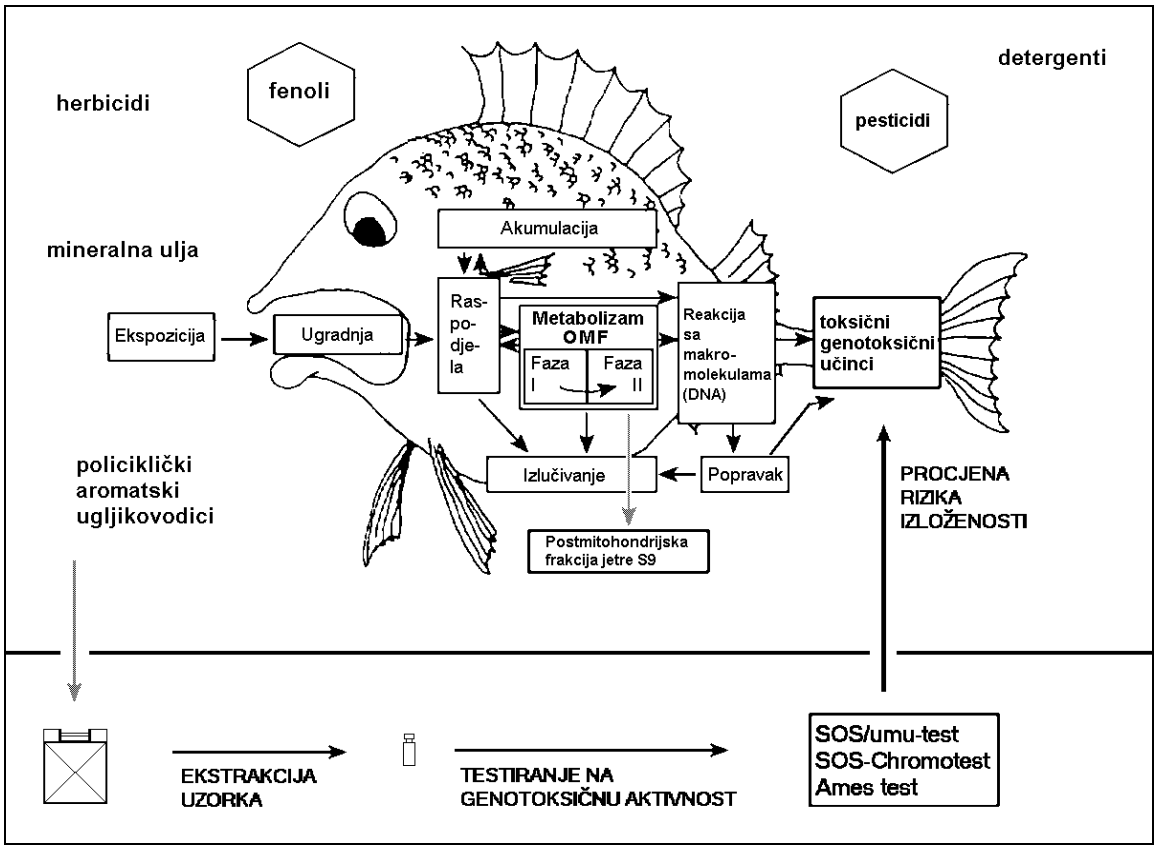
1. UVOD 8
1.1. Bioremedijacija 11
1.1.1. Lakaza 11
1.1.2. Nafta i zagađenje naftom 12
2. CILJ RADA 13
3. MATERIJALI I METODE 14
3.1. Materijali 14
3.1.1. Kemikalije 14
3.1.1.1. Priprava razrjeđenja modelnih spojeva 14
3.1.1.2. Priprava vodotopive frakcija nafte (VFN) 14
3.2. Metode 16
3.2.1. Bakterija *Salmonella typhimurium* 16
3.2.2. Priprema TGA tekućeg medija 16
3.2.3. Prekonoćna bakterijska kultura 16
3.2.4. Predkultura 16
3.2.5. Priprema inkubacijske suspenzije 17
3.2.6. Priprema reinkubacijske suspenzije 17
3.2.7. Mjerenje aktivnosti β-galaktozidaze 17
3.2.8. Indukcijski omjeri (IF) 18
3.2.9. Statistička obrada rezultata 18
4. REZULTATI 19
4.1. Bakterijski rast 19
4.2. Modelni spojevi 19
4.2.1. 4-Nitrokvinolin-N-oksid (4-NQO) 20
4.2.2. 2-Aminoantracen (2-AA) 21
4.2.3. Vodotopiva frakcija nafte 23
5. RASPRAVA 25
6. ZAKLJUČCI 27
7. LITERATURA 28
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA 30
9. BASIC DOCUMENTATION CARD 31

1. UVOD

Kemijski i fizički agensi koji oštećuju DNA i/ili mijenjaju stanične procese organizma vezane uz cjelovitost organizacije i aktivnosti genoma nazivaju se genotoksini. Niz genotoksičnih učinaka na organizme uslijed povećanog unosa antropogenog zagađenja opisan je također pod pojmom “sindrom genotoksične bolesti” kojeg karakteriziraju opće promjene u metabolizmu (inhibicija rasta i razvoja jedinke), degenerativni procesi, atrofija tkiva i organa, brže starenje, smanjena mogućnost prilagodbe i imunološkog odgovora, te na kraju i sam opstanak vrste (Kurelec, 1993).

Kategorizacija okoliša (onečišćenje) i procjena izloženosti organizama temelji se na detekciji genotoksina u okolišu i proučavanju učestalosti primarnih oštećenja i narušavanja mehanizama popravka DNA uslijed genotoksičnog stresa organizama. U principu otpust genotoksina u okoliš treba izbjegavati, jer povećano izlaganje genotoksinima može utjecati na sposobnost razmnožavanja organizama, voditi povećanoj nestabilnosti ekološkog sustava, te kod organizama izazvati specifične (neželjene) prilagodbe stresnoj situaciji. Konačno, nekontrolirana prisutnost genotoksina u bilo kojem dijelu ekološkog sustava je neželjena situacija (Würgler i Kramers,1992).

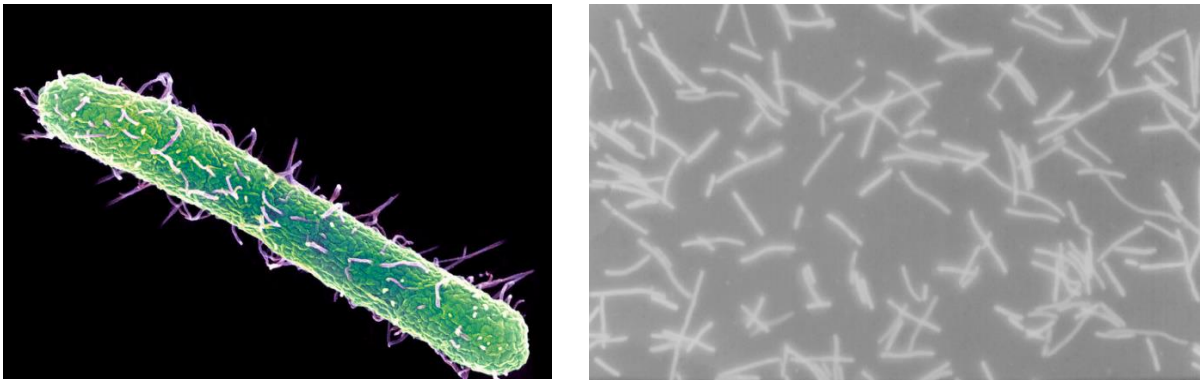
Obzirom na problem otpuštanja i prisustva genotoksina u otpadnim vodama i okolišu, predaje se sve veća pozornost postupcima pročišćavanja, uklanjanja i detoksifikacije, putem različitih procesa, organizama i tvarima koje obuhvaća pojam – bioremedijacija. Nakon kemijskih analiza uzoraka iz okoliša (npr. morski sediment), ovisno o koncentraciji prisutnih zagađivača, provode se daljnja ekotoksikološka istraživanja (Mamindy-Pajany i sur., 2011). Često testirani materijal treba zbrinuti i pritom napraviti „detoksifikaciju“ a jedan od njih je i postupak bioremedijacije. Za testiranje uspješnosti bioremedijacije genotoksičnih spojeva, kao i određivanje pogodnosti pojedinih enzima koji razgrađuju ili vežu genotoksine, prihvatljivi su brzi i jeftini kratkotrajni testovi genotoksičnosti koji otkrivaju prisustvo genotoksičnih spojeva u okolišu, izloženost organizama te mjere biološki učinak kao npr. indukcija popravka DNA i detoksifikacijskih enzima u jetri (EROD, S9). Slika 1. shematski prikazuje upotrebu kratkotrajnih bakterijskih testova kod otkrivanja genotoksičnih spojeva u uzorcima iz okoliša i izloženosti organizama istim.



Slika 1. Otkrivanje izloženosti organizama genotoksičnim spojevima pomoću bakterijskog umu-testa.

SOS/*umu*-test

Oda i suradnici 1985. razvili su *umu*-test kojim se otkriva i procjenjuje genotoksična aktivnost kemijskih tvari i uzoraka iz okoliša, a zasniva se na činjenici da oštećenje DNA i zaustavljanje replikacije inducira ekspresiju *umu* gena uključenog u SOS popravak (Oda i sur., 1985). Kao test organizam koristi se rekombinantni soj bakterije *Salmonela typhimurium* TA1535 (Slika 2) koji posjeduje višestruke kopije plazmida pSK1002. *S. typhimurium* je gram negativna i fakultativno anaerobna bakterija, koja spada u porodicu Enterobacteriaceae. Plazmid pSK1002 sadrži stopljeni gen *umu*C-*lac*Z i gen *amp* odgovoran za otpornost prema ampicilinu radi lakšeg selektivnog uzgoja bakterija. U sklopu SOS odaziva induciranog oštećenjem DNA genotoksičnim tvarima dolazi do prepisivanja ubačenog stopljenog gena *umu*C-*lac*Z čiji je produkt hibridni protein sa β-galaktozidaznom aktivnošću preko kojeg se mjeri genotoksična aktivnost testiranog uzorka (Hamer, 1997).



Slika 2. Bakterija *Salmonella typhimurium* pod: a) skenirajućim elektronskim mikroskopom i b) epifluorescentnim mikroskopom.

Dosadašnja istraživanja pokazala su dozni odaziv indukcije SOS funkcije u umu-testu testiranjem raznih materijala, dezinficijensa i njihovih metabolita, pesticida, hlapivih tvari, zagađivala zraka kao i spojeva koji različito oštećenju DNA. Test se može uspješno primijeniti za detekciju genotoksičnosti smjesa zagađivala otpadnih voda koje pokazuju kombinirano citotoksično i genotoksično djelovanje u svrhu određivanja izvora zagađenja i smanjenja ispusta potencijalno štetnih tvari u okoliš. Prag osjetljivosti umu-testa aproksimativno je jednak Ames testu i SOS-chromotestu, može se izvesti unutar radnog vremena (8 sati), a koristi se samo jedan soj test bakterija.

Od prve primjene umu-testa 1988. godine u detekciji genotoksina u rovinjskom priobalju do danas, rezultati testiranja u SOS/*umu*-testu čine ili su dio niza studija (potonuće broda “Brigitta Montanari”, UNEP/WHO, prostorni plan Županije istarske, havarija turskog broda „Und Adriatic“), projekata (Projekt Jadran) i niza izvornih znanstvenih radova objavljenih u časopisima sa međunarodnom recenzijom iz spomenutog područja utjecaja zagađivala na organizme u okolišu s posebnim osvrtom na genotoksičnost (Hamer i Batel, 2000).

Zbog porasta znanstvenog i javnog interesa za učinak genotoksina u okolišu pojavila se potreba za bioremidijacijom genotoksina odnosno zagađivala te ispitivanje različitih bioaktivnih spojeva u tu svrhu.

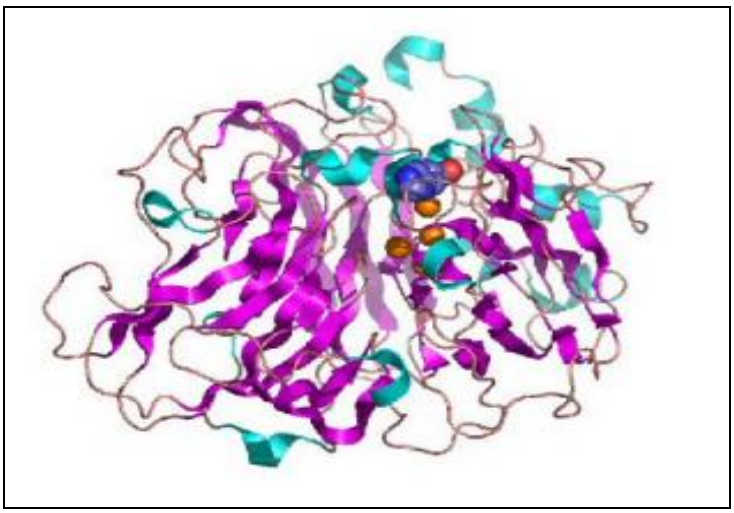
1.1. Bioremedijacija

Bioremedijacija je proces u kojem se koristi metabolički potencijal mikroorganizama kao što su bakterije i gljive kako bi se pročistila zagađena područja. Mikroorganizmi enzimima razgrađuju, odnosno metaboliziraju organske zagađivače iz tla ili voda i transformiraju ih u netoksične proizvode kao što su ugljikov dioksid (CO_2) i voda (H_2O). Za uspješno obavljanje procesa bioremedijacije potrebno je dobro poznavati karakteristike onečišćivala (topivost u vodi, kemijska reaktivnost), lokaliteta (dubina, rasprostranjenost i koncentracija onečišćivala u lokalitetu, tip tla) i mikroorganizama (moraju biti aktivni, tj. imati sposobnost biodegradacije određenog kontaminanta, dovoljno velika populacija, različite vrste razgrađuju različite kontaminante) jer o tome ovisi dužina trajanja samog procesa bioremedijacije koji može trajati i više godina. Bioremedijacija se može odvijati u aerobnim i anaerobnim uvjetima. Bioremedijacija je još uvijek tehnologija u razvoju, a osnovni razlog za to su problemi pri izvođenju bioremedijacije (ekosustav na koji djeluju različiti čimbenici kao što su tip i količina kontaminanta, klimatski uvjeti i hidrogeodinamika). Navedeni problemi su i razlog slabog napretka bioremedijacije u odnosu na ostale tehnologije. Zbog toga je neophodno sticane znanja i iskustava u pogledu formiranja najefikasnijih mikrobnih populacija, enzima i tehnologija sposobnih za bioremedijaciju zagađivala (Raičević i sur., 2007).

1.1.1. Lakaza

Lakaza je vrlo čest i široko rasprostranjen enzim koji pripada skupini oksidoreduktaza (Johannes i Majcherczyk, 2000). Lakaze pripadaju skupini mataloenzima jer aktivno mjesto sadrži atom bakra. Enzim lakaza je otkriven u mnogim biljkama, a izlučuju ga i brojne gljive, stoga se mogu podijeliti na dvije glavne skupine: porijeklom iz viših biljaka te iz gljiva. Lakaza porijeklom iz gljiva je znatno zastupljenija, a primarna funkcija joj je razgradnja lignina (trodimenzionalni, netopljivi aromatski polimer) u gljivama. Lakaza nema svojstvo specifičnosti prema točno određenom supstratu, kao ni svojstvo stereospecifičnosti, već lakaza djeluje na veliki broj različitih supstrata. Poznato je da sudjeluju u morfogenezi organizama domaćina, nastajanju melanina, sklerotizaciji kod kukaca, zaštiti biljaka od kukaca i mikroorganizama te oksidaciji povrća i voća. Sposobnost kataliziranja širokog spektra

reakcija i ekološka prihvatljivost čine enzim lakazu vrlo zanimljivim biokatalizatom za istraživanje (Tišma, 2008).



Slika 3. Pojednostavljeni prikaz strukture lakaze.

1.1.2. Nafta i zagađenje naftom

Nafta, kao vrsta fosilnog goriva, je tamna i viskozna tekućina koja se obično pronalazi ispod površine Zemlje ili morskog dna. To je vrlo složena smjesa različitih spojeva, čiji se sastav mijenja od nalazišta do nalazišta. Po svom kemijskom sastavu nafta je mješavina velikog broja različitih ugljikovodika, pretežito ugljikovodika alkanskog, cikloalkanskog i aromatskog reda i malih količina spojeva sumpora, kisika i dušika (od tragova i do 7 %). Onečišćenja naftom postala su česta pojava u posljednje vrijeme. Do onečišćenja okoliša može doći prilikom istraživanja ležišta nafte i njenom eksploatacijom, pri transportu, u tijeku prerade i pri potrošnji. Iako su tankerski incidenti najpoznatiji oni predstavljaju tek mali dio u zagađenju mora naftom. Daleko najveći izvor naftnog zagađenja mora predstavljaju izravna ili neizravna zagađenja koje dolaze sa kopna.

2. CILJ RADA

Cilj ovog završnog rada je bio određivanje potencijalnog bioremedijacijskog/aktivacijskog učinka enzima lakaze putem umu-testa na način da se bakterije u logaritamskoj fazi rasta inkubiraju sa i bez metaboličke aktivacije sa različitim razrjeđenjima uzoraka modelnih genotoksičnih spojeva:

- direktni genotoksin 4-nitrokvinolin N-oksid (4-NQO)
- indirektni genotoksin 2-amino antracen (2-AA)
- vodotopiva frakcija nafte (VFN)

uz prisustvo enzima lakaze kako bi utvrdila da li lakaza utječe na rezultate testiranih uzoraka, odnosno da li smanjuje ili povećava njihovu genotoksičnu aktivnost.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

U radu su korištene kemikalije isključivo analitičke čistoće i podrijetla kako slijedi:

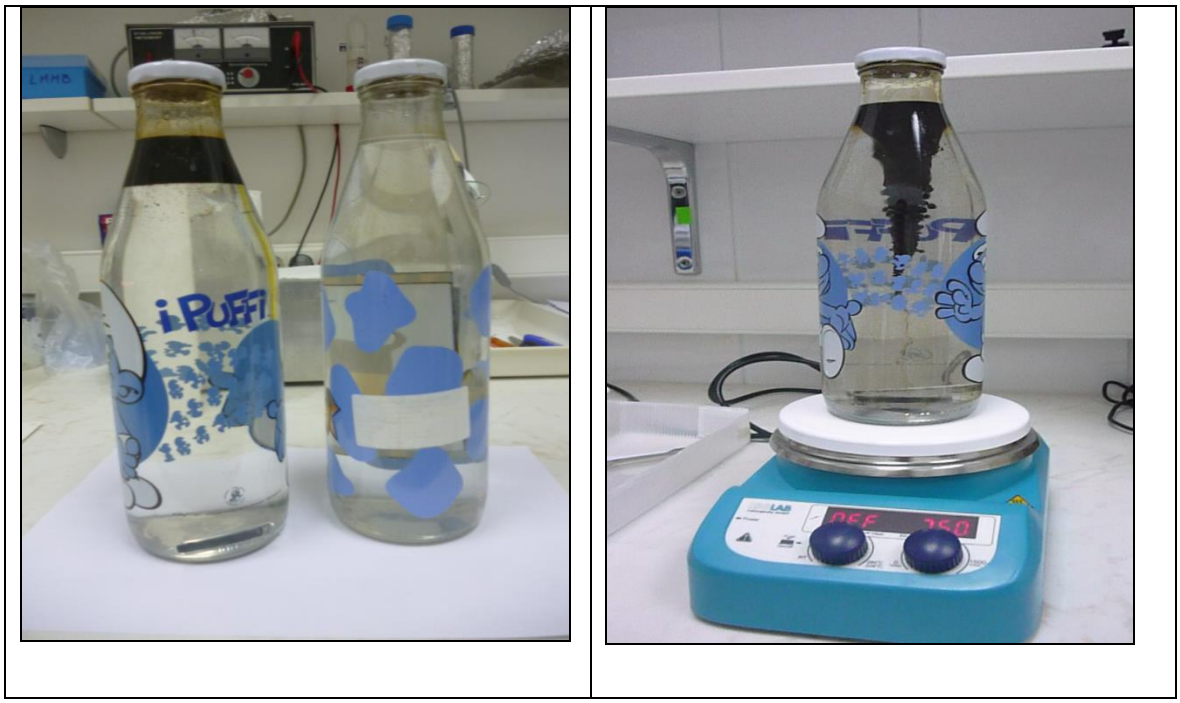
- *Sigma-Aldrich* - Dimetilsulfoxid (DMSO), 4-Nitrokvinolin-N-oksid (4-NQO), 2-Aminoantracen (2-AA), enzim Lakaza, ampicilin, i o-nitrofenil-β-D-galakopiranozid (ONPG), Glukoza-6-fosfat (G-6-P), Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADP), D(+) glukoza, SDS.
- *Kemika* – NaCl, KCl, MgCl2, Na2CO3.
- *Merck* – β –Merkaptoetanol.
- Postmitohondrijska frakcija jetre (S9) ribe *Dicentrarchus labrax*L., 1758 induciranog β-naftoflavonom u sezamovom ulju (6,3 mg/kg ribe).

3.1.1.1. Priprava razrjeđenja modelnih spojeva

Direktni genotoksin 4-nitrokinolin-N-oksid (4-NQO) smo otopili u DMSO-u u koncentraciji od 10 mg/ml. Radna otopina (0.1 µg/µl) dobivena je razrjeđenjem (10µl stok otopine +990µlotapala DMSO) te daljnjim serijskim razrjeđenjima 1:3. Isti postupak smo ponovili i sa indirektnim genotoksinom 2-aminoantracenom (2-AA).

3.1.1.2. Priprava vodotopive frakcija nafte (VFN)

Vodotopiva frakcija nafte je dobivena 24 satnim miješanjem autoklavirane morske vode (MV) s 10% lake ruske nafte uz pomoć magnetske miješalice (Slika 4). Kemijskom analizom utvrđeno je da litra VFN sadrži 1200 µg ukupnih ugljikovodika, odnosno 250 µg mineralnih ulja. U Tablici 1. prikazane su preračunate koncentracije VFN (faktor razrjeđenja – *D*) te razrjeđenja modelnih spojeva korištenih za proučavanje učinka enzima lakaze na genotoksičnu aktivnost putem umu-testa.



Slika 4. Priprema vodotopive frakcije nafte 24 satnim miješanjem na magentskoj miješalici.

Tablica 1. Koncentracije modelnih agenasa korištene za potrebe određivanja bioremedijacijskog učinka enzima lakaze.

Modelni spojevi	**Koncentracije**					
4-NQO (µg/ml)	0	0,012	0,037	0,111	0,333	1,000
4-AA (µg/ml)	0	0,012	0,037	0,111	0,333	1,000
VFN (*D*)	0	24	12	6	3	1,5

D – Faktor razrjeđenja, Kontrola 0 (4-NQO i 2-AA – DMSO te VFN - morska voda).

3.2. Metode

Određivanje remedijacijskog/aktivacijskog potencijala enzima lakaze napravljeno je primjenom umu-testa prema Hamer (1997) te protokolu: Kakvoća vode – Određivanje genotoksičnosti vode i otpadne vode primjenom umu-testa (ISO 13829: 2000).

3.2.1. Bakterija *Salmonella typhimurium*

U umu-testu kao test organizme koristili smo genetski modificirane bakterije *S. typhimurium* TA1535 koje su prethodno bile pohranjene u tekućem dušiku (Hamer, 1997). *Salmonella typhimurium* je gram negativna i fakultativno anaerobna bakterija, koja spada u porodicu Enterobacteriaceae.

3.2.2. Priprema TGA tekućeg medija

Izvagali smo 2 g glukoze, 5 g NaCl-a i 10 g Baktotriptona, te ubacili u bocu sa 1000 ml destilirane vode i miješali dok se sve nije otopilo. Zatim smo tu bocu autoklavirali u ekspres loncu te ohladili i pohranili u hladnjak na +4^{o}C.

3.2.3. Prekonoćna bakterijska kultura

Dan prije pred kraj radnog vremena, štok bakterija *S. typhimurium* (-80°C) smo centrifugirali (5 min/3000 g). Supernatant smo bacili, a bakterije resuspendirali u 1ml TGA medija. U tikvicu sa 20 ml TGA tekućeg medija, dodali smo 40 µl ampicilina (10 µg/µl) i inokulum bakterija te smo tikvicu stavili preko noći u vodenoj kupelji na 37°C uz mješanje.

3.2.4. Predkultura

Ujutro smo prebacili 1ml prekonoćne bakterijske kulture u 50 ml TGA medija, dodali 100 µl ampicilina i inkubirali u vodenoj kupelji na 37°C do 2 sata. Provjeravali smo optičku gustoću odnosno rast bakterija mjerenjem A600 300 µl predkulture sa

čitačem mikroploča (Ascent Multiscan, Labsystem). Postupak smo ponavljali sve dok čitač mikroploča nije izmjerio A600 u rasponu od 0,140 do 0,170 što označava da su bakterije dostigle eksponencijalnu fazu rasta.

3.2.5. Priprema inkubacijske suspenzije

Kad su se bakterije našle u eksponencijalnoj fazi rasta, izvadili smo bakterijsku predkulturu iz kupelji i stavili 260 µl pipetom u svaku jažicu mikroploče, zatim 10 µl 0,1 M fosfatnog pufera (pH7,4), 10 µl Lakaze (0,33 U), i 20 µl uzorka različitih razrjeđenja prethodno navedenih genotoksina. Mikroploča je inkubirana na 37°C dva sata uz mućkanje.U postupku testiranje uz metaboličku aktivaciju S9(+) te testiranja VFN korišten je i S9 mix koji sadrži kofaktore S9 frakciju jetre (2%), G-6-P i NADP, i 10x TGA medij radi metaboličke aktivacije genotoksina i povećavanja volumena uzorka kojeg se testira.

3.2.6. Priprema reinkubacijske suspenzije

Reinkubacija radi smanjenja učinka obojanosti uzoraka i pojačavanja osjetljivosti detekcije genotoksične aktivnosti putem umu-testa napravljena je razrjeđivanjem inkubacijske suspenzije (1:10) uz dodatnu inkubaciju od dva sata.

3.2.7. Mjerenje aktivnosti β-galaktozidaze

Aktivnost inducirane β-galaktozidaze je određenau 30 µl inkubacijske suspenzije s dodatkom 120 µl B-pufera na mikroploči. Mikroploče smo promućkali u inkubatoru (650 rpm/min) te dodali 30 µl ONPG supstrata. Inkubirali smo pločicu na 28°C, 30 min. Enzimsku reakciju smo prekinuli dodatkom 120 µl STOP otopine tj. 1M Na_2CO_3. Rast bakterija nakon inkubacije i reinkubacije određen je mjerenjem optičke gustoće (absorbancije) kod 600 nm (A600). Produkt enzimske reakcije između nastale β-galaktozidaze i supstrata određen je mjerenjem absorbancije kod 420 nm (A420).

3.2.8. Indukcijski omjeri (IF)

Omjer između jedinica aktivnosti β-galaktozidaze različitih razrjeđenja uzorka i slijepe probe (kontrole) daje indukcijski omjer (IF) koji najbolje izražava genotoksični potencijal testiranog uzorka i omogućuje usporedbu s drugim modelnim spojevima.

$IF=(1/BfG) \times ((A420_{uzorak} – A420_{SP})/(A420_{kontrola} - A420_{SP})$

BfG – rast bakterija, $A420_{SP}$ – apsorbancija slijepe probe

Dva su kriterija koja opisuju genotoksičnu aktivnost testiranog uzorka (spoja): 1) koncentracija uzorka koja udvostručuje aktivnost β-galaktozidaze (IF) dvostruko od kontrole, i 2) minimalna doza koja daje značajnu razliku aktivnost β-galaktozidaze (IF) uzorka u odnosu na kontrolu dobivena Bonferroni t-testom. Ako je indukcijski omjer od 1,5 do 2,0 spoj je slabo genotoksičan, 2,0 – 3,0 spoj je genotoksičan, a više od 3,0 spoj je vrlo genotoksičan. Smatra se da je uzorak koji daje indukcijski omjer veći od 1,5 pozitivan, tj. posjeduje genotoksičnu aktivnost ukoliko najmanje tri doze genotoksina pokazuju linearni dozni odaziv. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti sa pripadajućim standardnim devijacijama. Granica pozitivnosti indukcijski omjer od 1,5 prikazana je na slikama crtkanom linijom.

3.2.9. Statistička obrada rezultata

Ispitivanja su provedena u tri ponavljanja razrjeđenja uzorka (A, B i C). Statistička analiza značajnosti razlike učinka genotoksičnih aktivnosti (IF) između koncentracija modelnih spojeva inkubiranih sa i bez enzima lakaze rađena je Student t-testom (Statistica ver.8, Statsoft). Statistička značajna razlika uzeta je na razini značajnosti od $p<0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Bakterijski rast

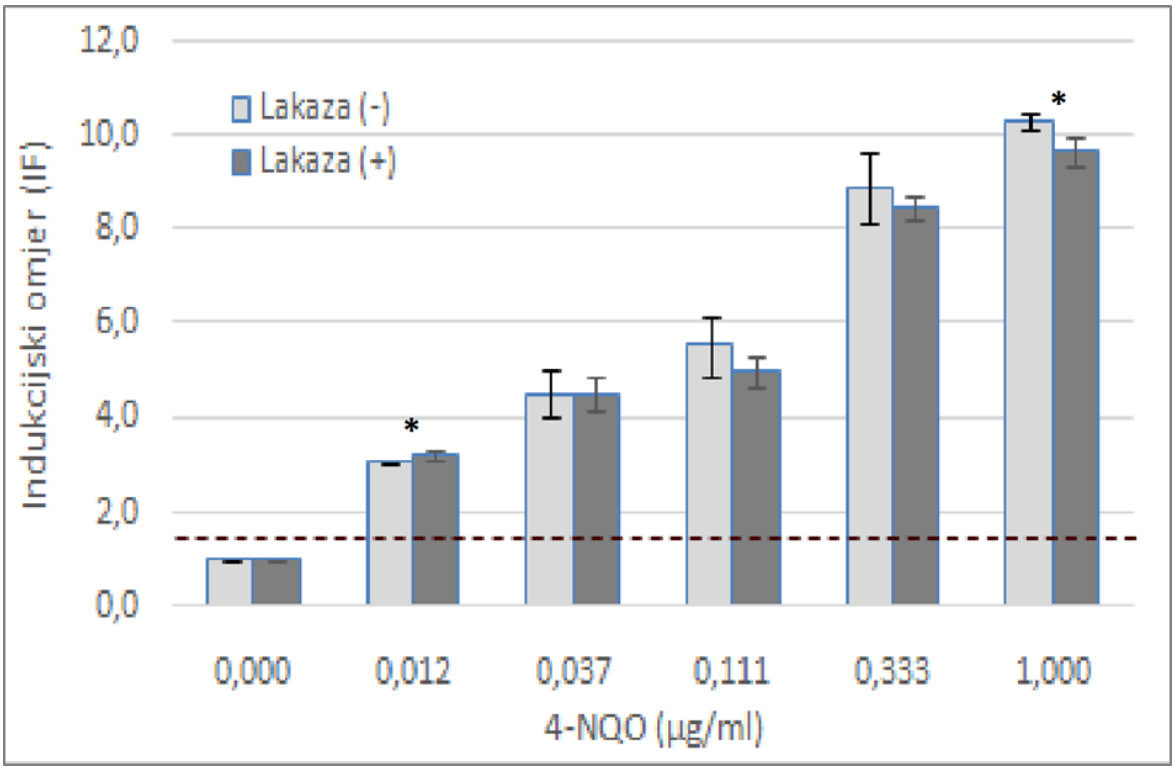
Učinak enzima lakaze kao i modelnih spojeva te nekoncentriranog uzorka VFN (faktora razrjeđenja: 1,5, 3, 6, 12 i 24 odnosno 100%, 50%, 25%, 12,5% i 6,25% uzorka), na rast bakterija sa i bez S9 metaboličke aktivacije u umu-testu bio je u granicama koje omogućavaju izračunavanje genotksične aktivnosti. Rast bakterija (BfG < 0,5) udovoljava vrednovanje genotoksične aktivnosti.

4.2. Modelni spojevi

Bioremedijacijski učinak enzima lakaze testiran je inkubacijom lakaze (1,00 U/ml) s različitim razrjeđenjima modelnih spojeva i određivanjem genotoksične aktivnosti modelnih spojeva. Genotoksični potencijal, odnosno aktivnost uzorka određena je mjerenjem aktivnosti β-galaktozidaze i izračunavanjem indukcijskih omjera (IF), a bioremidijacijski učinak je promatran usporedbom genotoksične aktivnosti koncentracija modelnih spojeva sa i bez enzima lakaze.

4.2.1. 4-Nitrokvinolin-N-oksid (4-NQO)

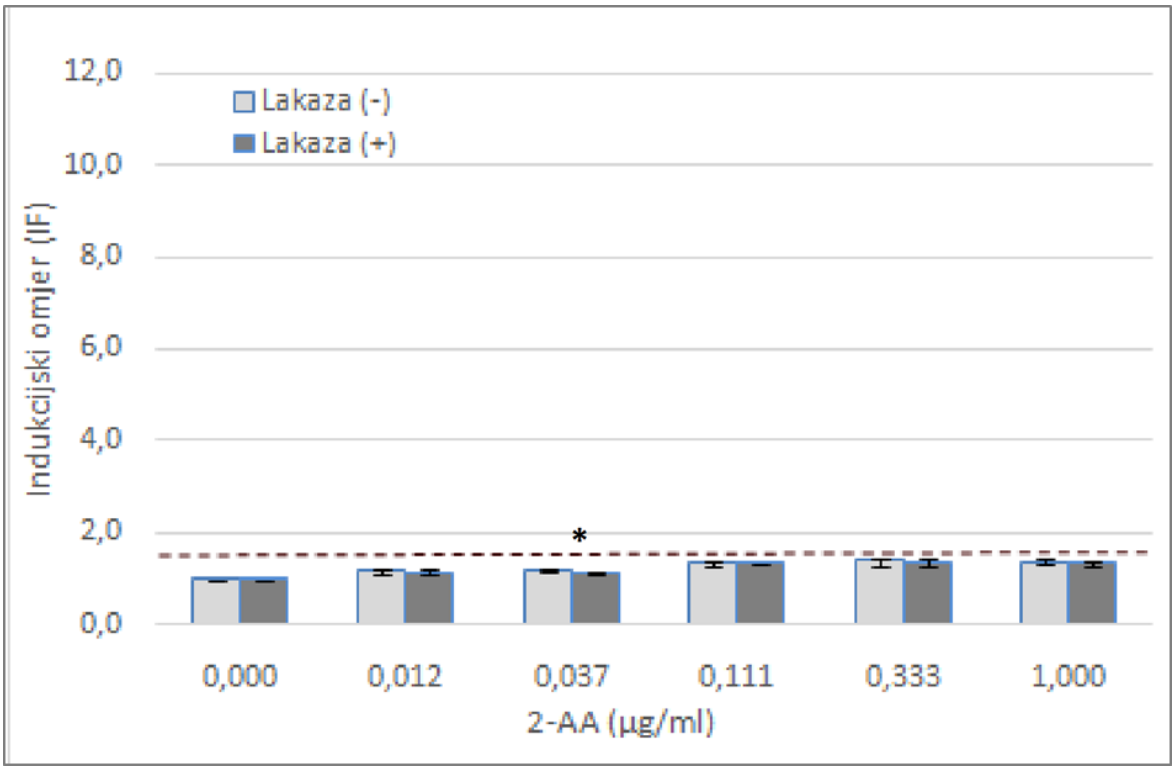
Iz slike 5. je vidljivo da indukcijski omjeri bakterija *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 nakon izlaganja direktnom modelnom spoju 4-NQO u koncentracijama 1,000, 0,333, 0,111, 0,037 i 0,012 µg/ml bez S9 metaboličke aktivacije daju pozitivan odgovor te povećanje koncentracije 4-NQO prati i povećanje genotoksične aktivnosti (IF) tzv. dozni odaziv. Iste te koncentracije modelnog spoja uz prisustvo enzima lakaze (1 U/ml) daju slične rezultate, s tim da kod većih koncentracija vrijednosti genotoksične aktivnosti su nešto niže.



Slika 5. Rezultati testiranja učinka enzima lakaze na genotoksičnu aktivnost serijskih razrjeđenja 4-NQO putem umu-testa S9(-). Granica pozitivnosti indukcijski omjer od 1,5 prikazana je crtkanom linijom. Zvjezdicom (*) je prikazana statistički značajna razlika ($p>0,05$) genotoksične vrijednosti koncentracije agensa sa i bez lakaze.

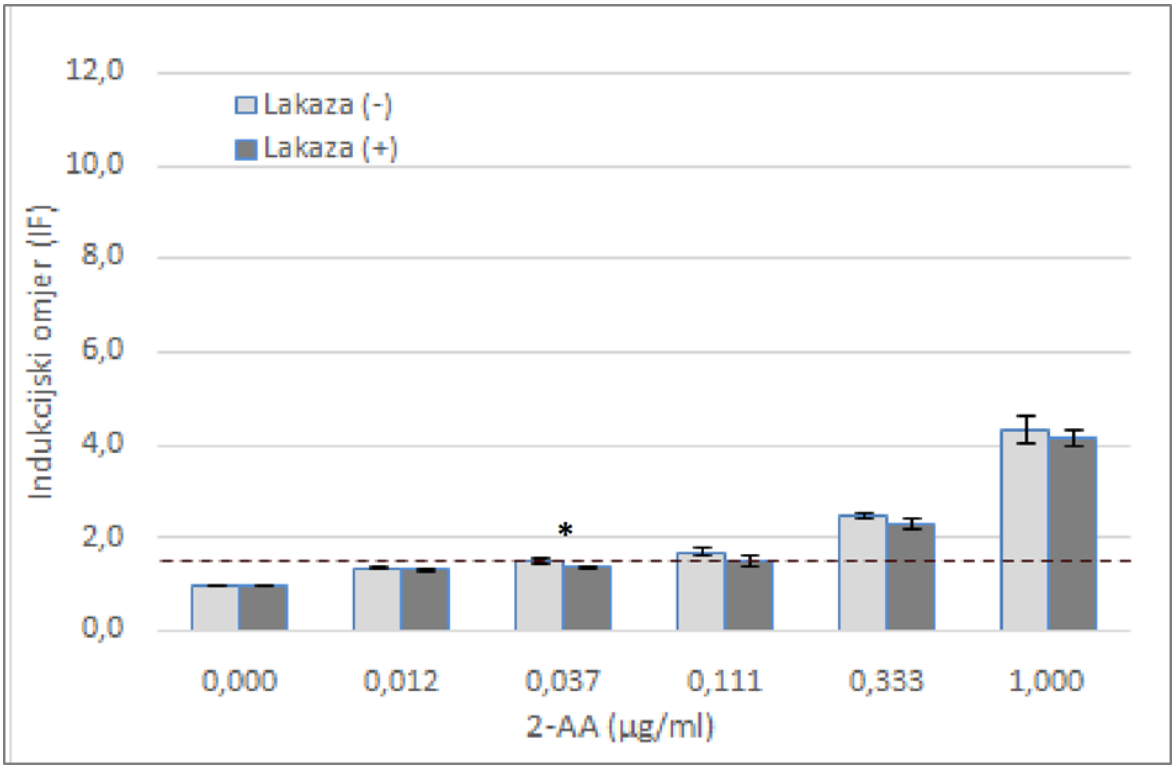
4.2.2. 2-Aminoantracen (2-AA)

Iz slike 6. je vidljivo da indukcijski omjeri bakterija *S. typhimurium* TA1535/pSK1002 nakon izlaganja indirektnom modelnom spoju 2-AA u koncentracijama 1,000, 0,333, 0,111, 0,037 i 0,012 µg/ml bez S9 metaboličke aktivacije ne daju pozitivan odgovor te povećanje koncentracije 2-AA ne prati i značajno povećanje genotoksične aktivnosti (IF). Iste te koncentracije modelnog spoja uz prisustvo enzima lakaze (1,00 U/ml) daju slične rezultate.



Slika 6. Rezultati testiranja učinka enzima lakaze na genotoksičnu aktivnost serijskih razrjeđenja 2-AA putem umu-testa S9(-). Granica pozitivnosti indukcijski omjer od 1,5 prikazana je crtkanom linijom. Zvjezdicom (*) je prikazana statistički značajna razlika (p>0,05) genotoksične vrijednosti koncentracija agensa sa i bez lakaze.

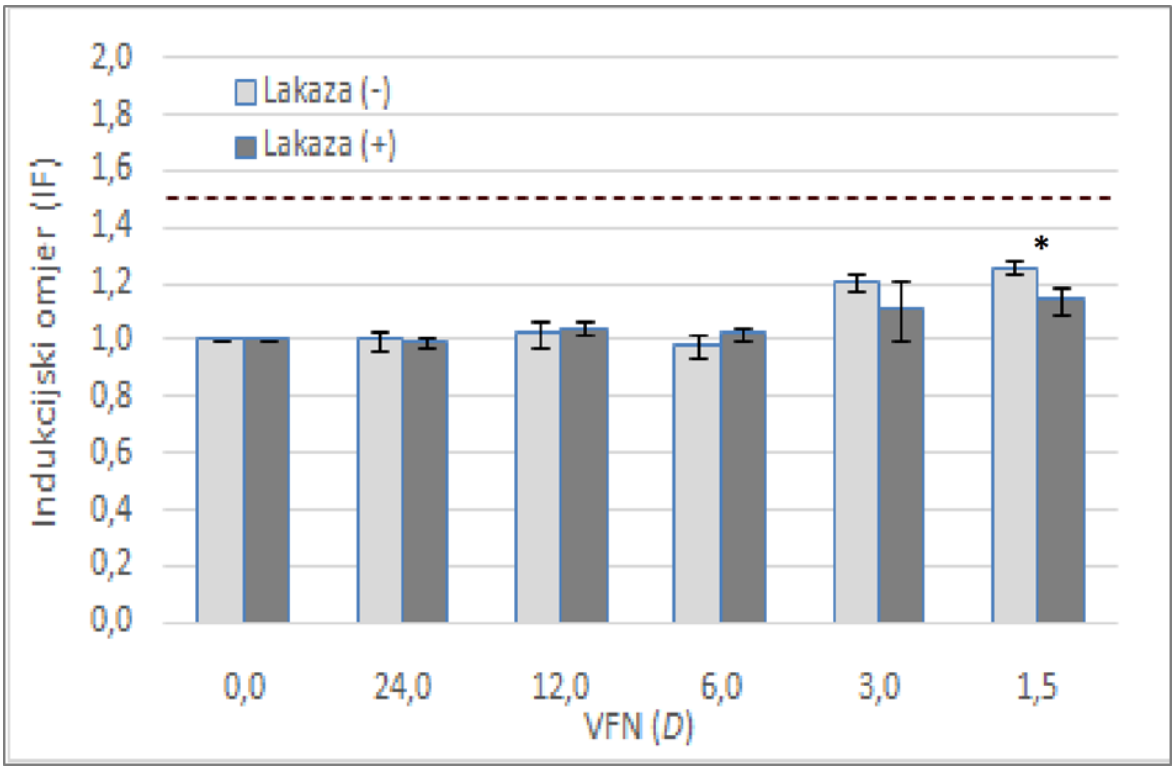
Iz slike 7. je vidljivo da indukcijski omjeri bakterija *S. typhimurium* TA1535/pSK1002 nakon izlaganja indirektnom modelnom spoju 2-AA u koncentracijama 1,000, 0,333, 0,111, 0,037 i 0,012 µg/ml uz S9 metaboličke aktivacije daju pozitivan odgovor te povećanje koncentracije 2-AA prati i povećanje genotoksične aktivnosti (IF). Iste te koncentracije modelnog spoja uz prisustvo enzima lakaze (1,00 U/ml) daju slične rezultate, s tim da su sve L+ vrijednosti nešto niže.



Slika 7. Rezultati testiranja učinka enzima lakaze na genotoksičnu aktivnost serijskih razrjeđenja 2-AA putem umu-testa S9(+). Granica pozitivnosti indukcijski omjer od 1,5 prikazana je crtkanom linijom. Zvjezdicom (*) je prikazana statistički značajna razlika (p>0,05) genotoksične vrijednosti koncentracija agensa sa i bez lakaze.

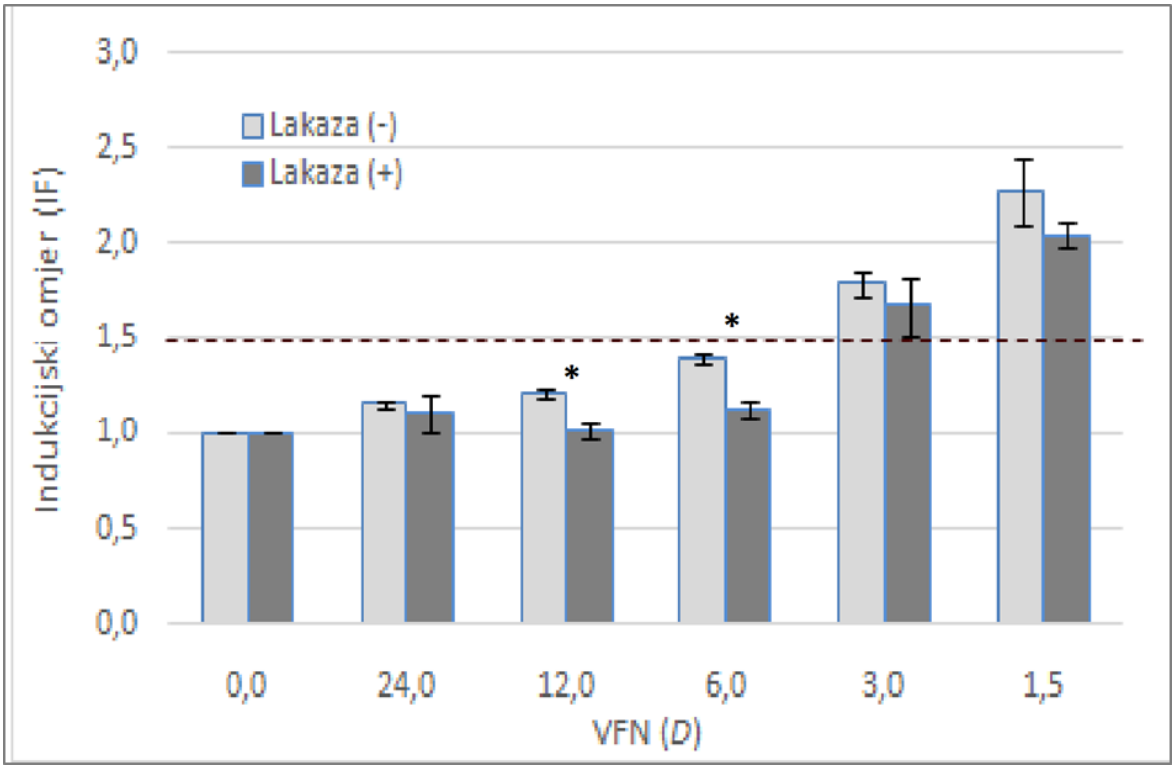
4.2.3. Vodotopiva frakcija nafte

Iz slike 8. je vidljivo da indukcijski omjeri bakterija *S. typhimurium* TA1535/pSK1002 nakon izlaganja nekoncentriranom uzorka VFN (faktora razrjeđenja: 1,5, 3, 6, 12 i 24 odnosno 100%, 50%, 25%, 12,5% i 6,25%) bez S9 metaboličke aktivacije ne daju pozitivan odgovor te povećanje smanjenje faktora razrjeđenja *D* ne prati i značajno povećanje genotoksične aktivnosti (IF). Iste te koncentracije modelnog spoja uz prisustvo enzima lakaze (1,00 U/ml) daju slične rezultate.



Slika 8. Rezultati testiranja učinka enzima lakaze na genotoksičnu aktivnost serijskih razrjeđenja VFN putem umu-testa S9(-). Granica pozitivnosti indukcijski omjer od 1,5 prikazana je crtkanom linijom. Zvjezdicom (*) je prikazana statistički značajna razlika (p>0,05) genotoksične vrijednosti koncentracija agensa sa i bez lakaze.

Iz slike 9. je vidljivo da indukcijski omjeri bakterija *S. typhimurium* TA1535/pSK1002 nakon izlaganja nekoncentriranom uzorku VFN (faktora razrjeđenja: 1,5, 3, 6, 12 i 24 odnosno 100%, 50%, 25%, 12,5% i 6,25%) uz S9 metaboličku aktivaciju daju pozitivan odgovor te smanjenje faktora razrjeđenja *D* prati i značajno povećanje genotoksične aktivnosti (IF). Iste te koncentracije modelnog spoja uz prisustvo enzima lakaze (1,00 U/ml) daju smanjenu genotoksičnu aktivnost VFN, razlika je statistički značajna (p>0,05) što govori da je lakaza razgradila dio ugljikovodika te se zbog toga genotoksična aktivnost VFN smanjila.



Slika 9. Rezultati testiranja učinka enzima lakaze na genotoksičnu aktivnost serijskih razrjeđenja VFN putem umu-testa S9(+). Granica pozitivnosti indukcijski omjer od 1,5 prikazana je crtkanom linijom. Zvjezdicom (*) je prikazana statistički značajna razlika (p>0,05) genotoksične vrijednosti koncentracija agensa sa i bez lakaze.

5. RASPRAVA

Određivanje potencijalnog bioremedijacijskog učinka enzima lakaze putem umu-testa napravljeno je određivanjem genotoksične aktivnosti modelnih spojeva 4-NQO i 2-AA te smjese ugljikovodika sadržanih u vodotopivoj frakciji nafte (VFN). Ovim završnim radom u svrhu preliminarnog testiranja potencijalnog bioremidijacijskog učinka lakaze odabrana je samo jedna koncentracija lakaze (1 U/ml inkubacijske suspenzije), koncentracija koja ima značaju metaboličku aktivnost određenu putem ABTS supstrata (Hamer i suradnici, neobjavljeni podaci).

Vrijednosti indukcijskih omjera (IF) modelnih spojeva u umu-testu sa i bez metaboličke aktivacije su u skladu s prethodnim rezultatima (biomonitoring Projekt Jadran, INAgip, CEMTRA) i onima iz literature (Bihari i sur., 1990; Reifferscheid i sur., 1991; Reifferscheid i Heil, 1996; Hamer, 1997; Hamer i sur., 2000).

Rezultati testiranja učinka enzima lakaze s modelnim spojevima bez metaboličke aktivacije S9(-) ukazuju da lakaza ne aktivira indirektan genotoksin 2-AA te ne izaziva dodatno povećanje genotoksične aktivnosti. Većina testiranih razrjeđenja modelnih spojeva uz prisustvo lakaze daje neznatno niže vrijednosti genotoksične aktivnosti, s tim da za neke koncentracije razlika je statistički i značajna na razini $p>0,05$ (4-NQO 1 i 0,012 µg/ml; 2-AA 0,037 µg/ml).

Rezultati testiranja učinka enzima lakaze s modelnim spojevima uz metaboličku aktivaciju S9(+) ukazuju da lakaza izaziva neznatno smanjenje genotoksične aktivnosti indirektnog genotoksina 2-AA. S tim da za neke koncentracije 2-AA (0,33, 0,111 i 0,037 µg/ml) razlika je statistički značajna na razini $p>0,05$.

Vidljivo je da lakaza smanjuje genotoksičnu aktivnost VFN, razlika je statistički značajna ($p>0,05$) što govori da je lakaza razgradila dio ugljikovodika te se zbog toga genotoksična aktivnost VFN smanjila. Navedeno ide u prilog potencijalnom bioremedijacijskom potencijalu enzima lakaze u svrhu detoksifikacije genotokičnih uzoraka ili okoliša. Evidentno je da enzim lakaza predstavlja bioaktivnu inducibilnu tvar uključenu u preživljavanje organizma (Nebert, 1979).

Sposobnost kataliziranja širokog spektra reakcija i ekološka prihvatljivost čine enzim lakaze vrlo zanimljivim biokatalizatorima za istraživanje (Tišma, 2008). Oksido-redukcijski enzim lakaza široko je rasprostranjen u carstvu biljaka i gljiva, iako mu je primarna funkcija razgradnja lignina, lakaza nema svojstvo specifičnosti prema točno određenom supstratu, kao ni svojstvo stereospecifičnosti te time djeluje na veliki broj različitih supstrata.

U svrhu daljnjih istraživanja procesa bioremedijacije i smanjenja genotoksičnosti npr. VFN, nužno je povećati njenu efikasnost i optimizirati troškove (Johannes i Majcherczyk, 2000).

6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog testiranja potencijalnog bioremedijacijskog i/ili aktivacijskog učinka enzima lakaze putem umu-testa određivanjem genotoksične aktivnosti modelnih spojeva 4-NQO i 2-AA te smjese ugljikovodika sadržanih u vodotopivoj frakciji nafte (VFN) zaključujem:

- odabrana koncentracija lakaze (1 U/ml), odnosno generalno sama lakaza ne posjeduje metaboličku aktivnost koja bi se mogla iskoristiti za metaboličku aktivaciju indirektnih genotoksina ili smjesa zagađivala koja sadrže indirektne genotoksine npr. umjesto S9 frakcije jetre,
- generalno, genotoksične vrijednosti koncentracija modelnih spojeva uz dodatak lakaze su smanjene, s tim da za neke koncentracije i razrjeđenja postoji i statistički značajna razlika ($p<0,05$) što ide u prilog da lakaza ima potencijalnu bioremedijacijsku vrijednost,
- bioremedijacija bi se mogla provoditi direktno dodatkom enzima ili inokulacijom organizama (gljive) koje sadrže i koriste lakazu,
- ovo je preliminarno testiranje te su nužna daljnja istraživanja i optimizacija uvjeta, što samog enzima, što postupka određivanja aktivnosti putem umu-testa.

7. LITERATURA

Bihari N., M. Vukmirović, R. Batel, R.K. Zahn (1990) Application of the SOS/*umu*-test in detection of pollution using fish liver S9 fraction, Comp. Biochem. Physiol. 95C, 15-18.

Hamer B. Primjena bakterijskog SOS/*umu*- testa u procjeni genotoksičnog djelovanja smjesa zagađivala i modelnih spojeva, magistarski rad, Poslijediplomski studij prirodnih znanosti Oceanologija - biologija, Zagreb, 1997.

Hamer B., N. Bihari, G. Reifferscheid, R.K. Zhan, W.E.G. Muller, R. Batel (2000) Evaluation of the SOS/umu-test post-treatment assay for the detection of genotoxic activities of pure compounds and complex environmental mixtures, Mutat. Res. 466, 161-171.

Hamer B., R. Batel (2000) Detekcija mutagenih i/ili genotoksičnih spojeva u okolišu pomoću bakterijskih testova: Ames test, SOS-Chromotest i SOS/*umu*-test, Gospodarstvo i okoliš, 47: 572-574.

ISO 13829: 2000, Water quality - Determination of the genotoxicity of water and waste water using the umu-test.

Johannes C., A. Majcherczyk (2000) Laccase activity tests and laccase inhibitors, J. Biotech., 78: 193–199.

Kurelec B. (1993) The genotoxic disease syndrome. Mar. Environ. Res. 35: 341-348.

Mamindy-Pajany Y., B. Hamer, M. Roméo, F. Géret, F. Galgani, E. Durmiši, C. Hurel, N. Marmier (2011) The toxicity of composted sediments from Mediterranean ports evaluated by several bioassays. Chemosphere 82: 362-369.

Nebert D.W. (1979) Multiple forms of inducibile drug-metabolizing enzymes: a reasonable machanism by wich any organism can cope with a diversity. Mol. Cell. Biochem. 27: 27-46.

Oda Y., S. Nakamura, I. Oki, T. Kato, H. Shinagawa (1985) Evaluation of the new system (umu test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens, Mutat. Res. 147: 219-229.

Raičević V., B. Lalević , D. Dabić, D. Kiković, L. Jovanović, M. Nikšić (2007) Mikroorganizmi u bioremedijaciji zemljišta i voda zaštita materijala, stručni rad, Zaštita materijala, 2: 49-51.

Reifferscheid G., J. Heil (1996) Validation of the SOS/umu test using results of 486 chemicals and comparison with the Ames test and carcinogenicity data. Mutat. Res. 369: 129-145.

Reifferscheid G., J. Heil, Y. Oda, R.K. Zahn (1991) A microplate version of the SOS/umu- test for rapid detection of genotoxins and genotoxic potentials of environmental sample., Mutat. Res. 253: 215-222.

Tišma M. Oksidacija fenolnih spojeva lakazom iz *Trametes versicolor* u različitim tipovima reaktora, magistarski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2008.

Würgler, F.E., P.G.N. Kramers (1992) Environmental effects of genotoxins (eco-genotoxicology). Mutagenesis 7: 321-327.

8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

SVEUČULIŠTE JURJA DOBRILE U PULI

SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ – ZNANOST O MORU

Određivanje potencijalnog bioremedijacijskog učinka enzima lakaze putem umu-testa

SAŽETAK

Uslijed porasta znanstvenog i javnog interesa učinaka genotoksina u okolišu pojavila se potreba za bioremedijacijom zagađivala te ispitivanjem različitih bioaktivnih spojeva i procesa u tu svrhu. Bioremedijacija je proces u kojem se koristi metabolitički potencijal mikroorganizama kao što su bakterije i gljive kako bi se pročistila zagađena područja i materijal. Metaloenzim lakaza je čest i široko rasprostranjen enzim koji pripada skupini oksidoreduktaza, a primarna funkcija joj je razgradnja lignina u gljivama. Lakaza nema svojstvo specifičnosti prema točno određenom supstratu, kao ni svojstvo stereospecifičnosti. Bioremedijacijski učinak enzima lakaze testiran je inkubacijom lakaze s različitim razrjeđenjima modelnih spojeva određivanjem genotoksične aktivnosti putem umu-testa. Genotoksični potencijal, odnosno aktivnost uzorka određena je mjerenjem aktivnosti β-galaktozidaze i izračunavanjem indukcijskih omjera (IF), a bioremidijacijski učinak je promatran usporedbom genotoksične aktivnosti koncentracija modelnih spojeva sa i bez enzima lakaze. Na temelju rezultata lakazom smanjene genotoksične aktivnosti modelnih spojeva 4-NQO i 2-AA te smjese ugljikovodika sadržanih u vodotopivoj frakciji nafte (VFN) proizlazi zaključak da odabrana koncentracija lakaze (1,00 U/ml) ima potencijalnu bioremedijacijsku vrijednost te ne posjeduje metaboličku aktivnost koja bi se mogla iskoristiti za metaboličku aktivaciju indirektnih genotoksina umjesto S9 frakcije jetre. Ovo je preliminarno testiranje te su nužna danja istraživanja i optimizacija uvjeta, što samog enzima, što postupka određivanja aktivnosti putem umu-testa.

Rad je pohranjen u knjižnici Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli.

Izvornik je na hrvatskom jeziku (31 stranica, 9 slika, 15 literaturnih navoda)

Ključne riječi: umu-test, genotoksičnost, vodotopiva frakcija nafte, bioremedijacija, lakaza.

9. BASIC DOCUMENTATION CARD

JURAJ DOBRILA UNIVERSITY OF PULA

UNIVERSITY UNDERGRADUATE STUDY PROGRAMME - MARINE SCIENCES

Potential bioremediation effect determination of enzyme laccase using the umu-test

ABSTRACT

Due to increased scientific and general public interest of genotoxin effects in the environment, bioremediation of the toxicants and further investigation of a vast spectrum of bioactive compounds is needed. Bioremediation is a process in which metabolic potential of microorganisms, such as bacteria and fungi, is used to cleanse contaminated areas and materials. Metalloenzyme laccase is a frequent and widespread enzyme of the oxidoreductase group and his primary function is degradation of lignin in fungi. Laccase is not specific to a substrate nor is it stereospecific. Bioremediation effect of the lactase enzyme was tested by incubation of lactase with different dilutions of model compounds and determination of genotoxic activity by umu-test. Genotoxic potential, in other words, genotoxic activity, was determined by measuring β-galactosidase activity and calculating induction ratio (IR), while the bioremediation effect was observed through comparison of genotoxic activity of model compounds concentrations with and without laccase. Based on the results of diminished genotoxic activity of model compounds 4-NQO, 2-AA and the mixture of hydrocarbons present in the water soluble fraction of crude oils (WSF). From presented data it is possible to conclude that laccase concentration of 1 U/ml has a potentially bioremediative value and does not possess metabolic activity which could be used for metabolic activation of indirect genotoxins instead of the S9 liver fraction. This is a preliminary experiment and further examinations and optimization of conditions are needed regarding both the enzyme and determination of activity by umu-test.

The thesis is stored in the Library of Juraj Dobrila University of Pula.

Original in Croatian (31 pages, 9 images, 15 references)

Keywords: umu-test, genotoxicity, watersolubile fraction of crude oil, bioremediation, laccase.