

Dorota DOMARADZKA, Urszula GUZIK, Danuta WOJCIESZYŃSKA*

BIOTRANSFORMACJA NAPROKSENU PRZEZ SZCZEP *PSEUDOMONAS STUTZERI*

Szczep *Pseudomonas stutzeri* wykazywał zdolność do biotransformacji 6 mg/l naproksenu w ciągu 35 dni. W hodowli gdzie jedynym źródłem węgla i energii był badany lek obserwowano ok. 32% ubytek związku, natomiast w hodowlach kometabolicznych z fenolem i glukozą wynosił on odpowiednio 37% i 59%. Ponadto oznaczono enzymy biorące udział w biotransformacji związków aromatycznych. Stwierdzono aktywność 3 enzymów z pośród 8 badanych, które brały udział w transformacji naproksenu w hodowlach kometabolicznych zarówno z fenolem, jak i z glukozą: monooksygenazy fenolowej, 1,2-dioksygenazy hydroksyhydrochinonowej i 1,2-dioksygenazy gentyzynowej. Na tej podstawie zaproponowano transformację leku poprzez etapy hydroksylacji i rozszczepienia pierścienia aromatycznego.

1. WSTĘP

Naproksen (kwas 2-(6-metoksynaftaleno-2-ilo)propionowy) jest związkiem dwupierścieniowym, pochodną kwasu arylopropionowego i należy do zróżnicowanej pod względem chemicznym grupy niesterydowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) dostępnych bez recepty. Ze względu na łatwą dostępność jak i duże zapotrzebowanie na leki o działaniu przeciwbólowym, przeciwgorączkowym i przeciwzapalnym, w ostatnich latach obserwuje się wzrost ich produkcji i sprzedaży. Skutkiem tego jest zanieczyszczenie wód powierzchniowych, podziemnych oraz wody przeznaczonej do picia. Można wyróżnić wiele dróg przedostawania się tych związków do środowiska wodnego, a głównym źródłem tych farmaceutyków są ścieki [1, 25, 31]. NLPZ występujące w środowisku mogą akumulować się w tkankach organizmów, prowadząc do zaburzenia pracy ich organów, dlatego najbardziej niebezpieczna jest długotrwała ekspozycja na działanie tych farmaceutyków nawet w małych dawkach [28]. Naproksen będąc stosunkowo trwałym związkiem chemicznym

* Uniwersytet Śląski, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biochemii, ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice

nie jest całkowicie eliminowany podczas procesów oczyszczania ścieków w oczyszczalni. Metody fizyko-chemiczne skutecznie eliminują naproksen, jednak prowadzą do akumulacji produktów – szczególnie hydroksylowanych pochodnych, które są bardziej toksyczne od związku wyjściowego [3, 12, 21]. Alternatywą jest więc jego biologiczna degradacja. Dotychczas poznano jedynie organizmy, które skutecznie transformują naproksen. Należą one przede wszystkim do grzybów białej zgnilizny [17, 23]. Ze względu na coraz większe stężenie naproksenu w środowisku (w wodach powierzchniowych Polski jego stężenie waha się od 0,08 do 0,75 $\mu\text{g/l}$ [13]) i brak skutecznych metod jego eliminacji podjęto badania nad biotransformacją naproksenu przez szczep *Pseudomonas stutzeri*.

2. METODYKA BADAŃ

2.1. PROWADZENIE HODOWLI BAKTERYJNYCH

W badaniach nad biotransformacją naproksenu zastosowano Gram-ujemną pałeczkę *Pseudomonas stutzeri*, pozyskaną z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu, ze względu na zdolność tego szczepu do degradacji naftalenu, którego pochodną jest naproksen [19]. Bakterie namnażano jak i adaptowano do wzrastających stężeń naproksenu w pożywce bulionowej (BIOMED, Warszawa), a następnie przenoszono do kolb o objętości 1000 ml zawierających 500 ml pożywki mineralnej o składzie: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – 3,78 g/l; KH_2PO_4 – 0,5 g/l; NH_4Cl – 5,0 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2 g/l; ekstrakt drożdżowy – 0,01 g/l i pH 7,1-7,3. Jako źródło węgla i energii, w hodowlach monosubstratowych, stosowano naproksen (SIGMA-ALDRICH; USA) w stężeniu 6 mg/l, natomiast w hodowlach kometabolicznych 282 mg/l fenolu lub 1 mg/l glukozy. Naproksen do hodowli dodawano jednorazowo w ilości 6 mg/l, natomiast odpowiednią dawkę glukozy lub fenolu wprowadzano co 7 dni. Równocześnie założono hodowlę abiotyczną, w której badany szczep poddano sterylizacji. Do tak przygotowanej hodowli, wprowadzano naproksen w stężeniu 6 mg/l. Hodowle prowadzono przez 35 dni w 30°C w warunkach wytrząsania – 130 rpm. Co siedem dni oznaczano gęstość hodowli, przez pomiar absorbancji światła przy długości fali $\lambda=600$ nm (OD_{600}), stężenie substratów wzrostowych (glukozy lub fenolu), oraz stężenie naproksenu. Jeśli wartość OD_{600} była większa lub równa 0,8 to do hodowli nie dodawano substratu wzrostowego. Ponadto w 35 dniu prowadzenia hodowli oznaczano enzymy zaangażowane w biotransformację naproksenu.

2.2. OZNACZENIE STĘŻENIA SUBSTRATÓW IZOLACJA I OZNACZENIE AKTYWNOŚCI ENZYMÓW

Stężenie naproksenu w hodowli oznaczano metodą HPLC w odwróconym układzie faz. W tym celu pobierano 1,5 ml hodowli bakteryjnej i odwirowywano. Przygotowaną

próbkę analizowano z użyciem chromatografu cieczowego firmy Merck, wyposażonego w kolumnę kapilarną LiChrospher® RP-18 (250x4mm) i przedkolumnę LiChroCART® 250-4 Nucleosil 5 C 18 oraz detektor UV/VIS typu DAD. Objętość nastrzyku na kolumnę wynosiła 10 µl. Faza ruchoma zawierała kwas octowy oraz 50% v/v acetonitryl. Detekcję związku obserwowano przy długości fali $\lambda=260$ nm i czasie retencji 2,30 min. Stężenie fenolu oznaczano metodą z *p*-nitroaniliną [15], natomiast stężenie glukozy metodą Miller'a [18].

2.3. OZTYNACZENIE AKTYWNOŚCI ENZYMÓW

Izolację enzymów zaangażowanych w biotransformację naproksenu przeprowadzono metodą Hegeman'a [10]. Stężenie białka w surowej frakcji enzymatycznej oznaczano metodą Bradford [4]. Aktywności enzymów oznaczano odpowiednio: monooksygenazę fenolową – metodą Lechner'a [14], dioksygenazę naftalenową – metodą Cidaria [5], 1,2-dioksygenazę hydroksyhydrochinonową – metodą Wei [27], 1,2-dioksygenazę katecholową i 2,3-dioksygenazę katecholową – metodą Hegeman'a [10], 1,2-dioksygenazę gentyzynową – metodą Feng [7], 4,5-dioksygenazę protokatechową – metodą Stanier i Ingraham [26] oraz 3,4-dioksygenazę kwasu protokatechowego – metodą Hou [11].

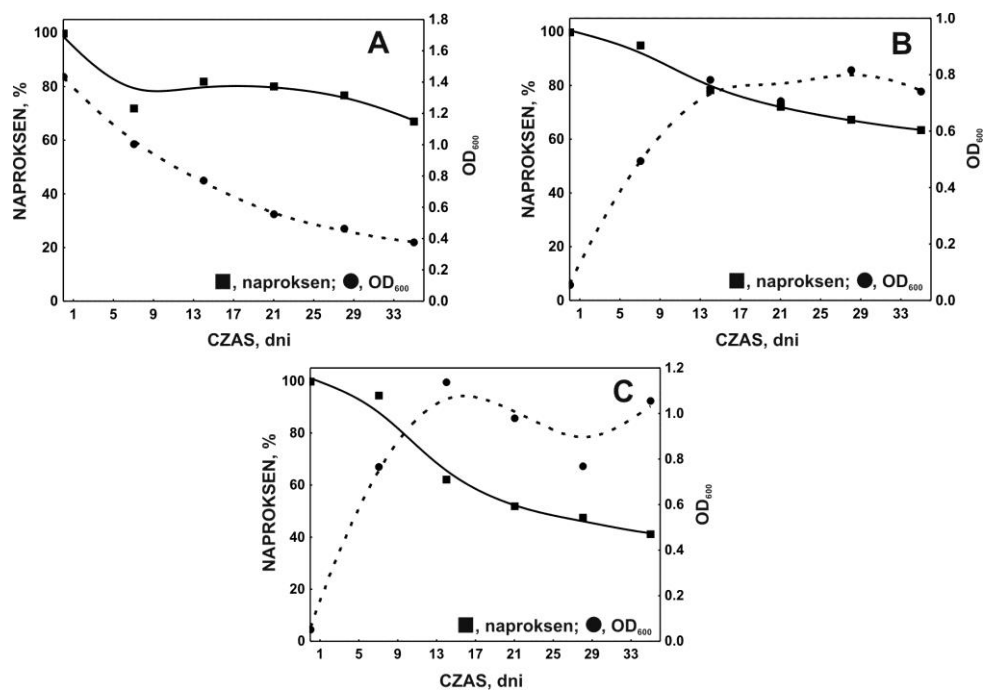
3. WYNIKI I DYSKUSJA

W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, że szczep *Pseudomonas stutzeri* transformował 32,59% naproksenu (hodowla monosubstratowa), w ciągu 35 dni (rys. 1A.). Ze względu na obserwowaną w środowisku naturalnym fotodegradację leku [29] równocześnie prowadzono kultury abiotyczne. Nie obserwowano w nich spadku stężenia naproksenu, co wskazywało, że jego ubytek w hodowlach z żywymi bakteriami zachodził w całości na drodze biologicznego utleniania. W hodowli monosubstratowej równocześnie zaobserwowano spadek gęstości bakterii, co świadczyło o tym, że naproksen nie był wystarczającym źródłem węgla i energii w stężeniu 6 mg/l dla szczepu *Pseudomonas stutzeri*.

Ze względu na spadek biomasy zastosowano hodowle kometaboliczne z fenolem lub glukozą jako substratami wzrostowymi. Kometabolitem w tych układach był naproksen. Zasadność stosowania takich układów wynika z faktu, że w warunkach naturalnych ksenobiotyki występują w obecności innych związków, zarówno toksycznych jak i nie toksycznych, które mogą stanowić dodatkowe źródło węgla. Substrat wzrostowy przyczynia się do przyrostu biomasy hodowli, co zwiększa zdolności biotransformacyjne, a także może wpłynąć na zmniejszenie toksycznego oddziaływania ksenobiotyku [6,24]. Ze względu na obecność struktury aromatycznej zastosowano jako substrat wzrostowy fenol. Obecność tego związku w badanych układach mogła przyczynić się do indukcji enzymów zaangażowanych w rozkład struktury aromatycznej, co w kon-

sekwencji prowadziło do wydajniejszej biotransformacji naproksenu. Drugim z zastosowanych substratów wzrostowych była glukoza. Spodziewano się, że w obecności tego łatwo przyswajalnego źródła węgla, będzie dochodzić do szybkiego wzrostu badanego szczepu oraz do syntezy kofaktorów niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania enzymów zaangażowanych w procesy transformacji. Ponadto zastosowanie substratu o całkowicie odmiennej strukturze od kometabolitu uniemożliwia zachodzenie efektu inhibicji kompetycyjnej, do którego może dochodzić podczas konkurencji o miejsce aktywne enzymu pomiędzy substratem wzrostowym, a kometabolitem o podobnej budowie. Stymulacja biotransformacji niesterydowych leków przeciwpalnych, w tym naproksenu, w obecności glukozy była wcześniej obserwowana w hodowlach kometabolicznych z udziałem *Phanerochaete chrysosporium* [23].

Pseudomonas stutzeri wykazywał większą zdolność do transformacji naproksenu w układach kometabolicznych niż w monosubstratowych. W hodowli z fenolem naproksen był eliminowany w 36,59% (rys. 1B.), natomiast w układzie z glukozą w 58,75% (rys. 1C.). Mniejsza wydajność biotransformacji naproksenu w układzie z fenolem, w porównaniu z układami prowadzonymi w obecności glukozy, była najprawdopodobniej spowodowana konkurencją o miejsce aktywne enzymu. W wyniku zastosowania układów kometabolicznych zaobserwowano stały wzrost hodowli bakteryjnych w badanych układach.



Rys. 1. Biotransformacja naproksenu przez *Pseudomonas stutzeri* (A – hodowla monosubstratowa, B – hodowla kometaboliczna z fenolem, C – hodowla kometaboliczna z glukozą)

W badaniach podjęto także próbę identyfikacji enzymów zaangażowanych w biotransformację badanego leku. W tym celu przeprowadzono izolację i oznaczono aktywność ośmiu najczęściej indukowanych enzymów podczas biotransformacji struktury aromatycznej, w hodowlach z fenolem oraz glukozą. Nie przeprowadzono izolacji enzymów z hodowli monosubstratowej ze względu na niską biomasę bakterii. W tabeli 1 przedstawiono aktywność właściwą czterech spośród 8 badanych biokatalizatorów.

Tabela 1. Aktywność właściwa wybranych enzymów degradacyjnych indukowanych podczas biotransformacji naproksenu w hodowlach kometabolicznych z fenolem lub glukozą

Badany enzym	Aktywność właściwa enzymu [U/mg]	
	fenol+naproksen.	glukoza+naproksen
monooksygenaza fenolowa	22,02±2,4	25,32±4,9
1,2-dioksygenaza hydroksyhydrochinonowa	470,72±9,4	45,95±15,5
2,3-dioksygenaza katecholową	426,75±58,6	0,0±0,0
1,2-dioksygenaza gentyzynowa	20,91±8,4	189,39±0,0

W hodowlach nie stwierdzono aktywności pozostałych czterech enzymów: dioksygenazy naftalenowej, zaangażowanej w dihydroksylację związków aromatycznych, 1,2-dioksygenazy katecholowej, enzymu zaangażowanego w rozszczepienie intardiolowe hydroksyloowanych związków aromatycznych, takich jak katechol, do kwasu *cis,cis*-mukonowego, 3,4-dioksygenazy kwasu protokatechowego, rozszczepiającej strukturę kwasów aromatycznych pomiędzy 3 i 4 węglem pierścienia oraz 4,5-dioksygenazy protokatechowej, enzymu katalizującego rozszczepienie kwasu protokatechowego oraz jego pochodnych w pozycji 4,5 [2, 8, 16, 26]. Zazwyczaj w biotransformacji ksenobiotyków pierwszym etapem jest hydroksylacja pierścienia aromatycznego, który następnie ulega rozszczepieniu z udziałem odpowiednich dioksygenaz rozszczepiających [20]. Oznaczona aktywność enzymów sugeruje, że za hydroksylację pierścienia aromatycznego naproksenu w hodowli *Pseudomonas stutzeri* odpowiada monooksygenaza fenolowa, której aktywność wykazano zarówno w hodowli kometabolicznej z fenolem jak i z glukozą. W następnym etapie badany lek ulega rozszczepieniu, o czym świadczy wysoka aktywność enzymów rozszczepiających: intradiolowej 1,2-dioksygenazy hydroksyhydrochinonowej oraz ekstradiolowej 1,2-dioksygenazy gentyzynowej. W hodowli z fenolem i naproksem obserwowano dodatkowo aktywność ekstradiolowej 2,3-dioksygenazy katecholowej, której aktywności nie stwierdzono w hodowli z glukozą i naproksem, co sugeruje rozkład fenolu drogą ekstradiolową do aldehydu 4-hydroksymukonowego.

W trakcie prowadzenia hodowli analizowano również uzyskiwane chromatogramy. W hodowli z glukozą zaobserwowano pojawienie się dodatkowych pików świadczących o pojawieniu się intermediatów rozkładu naproksenu (tab.2).

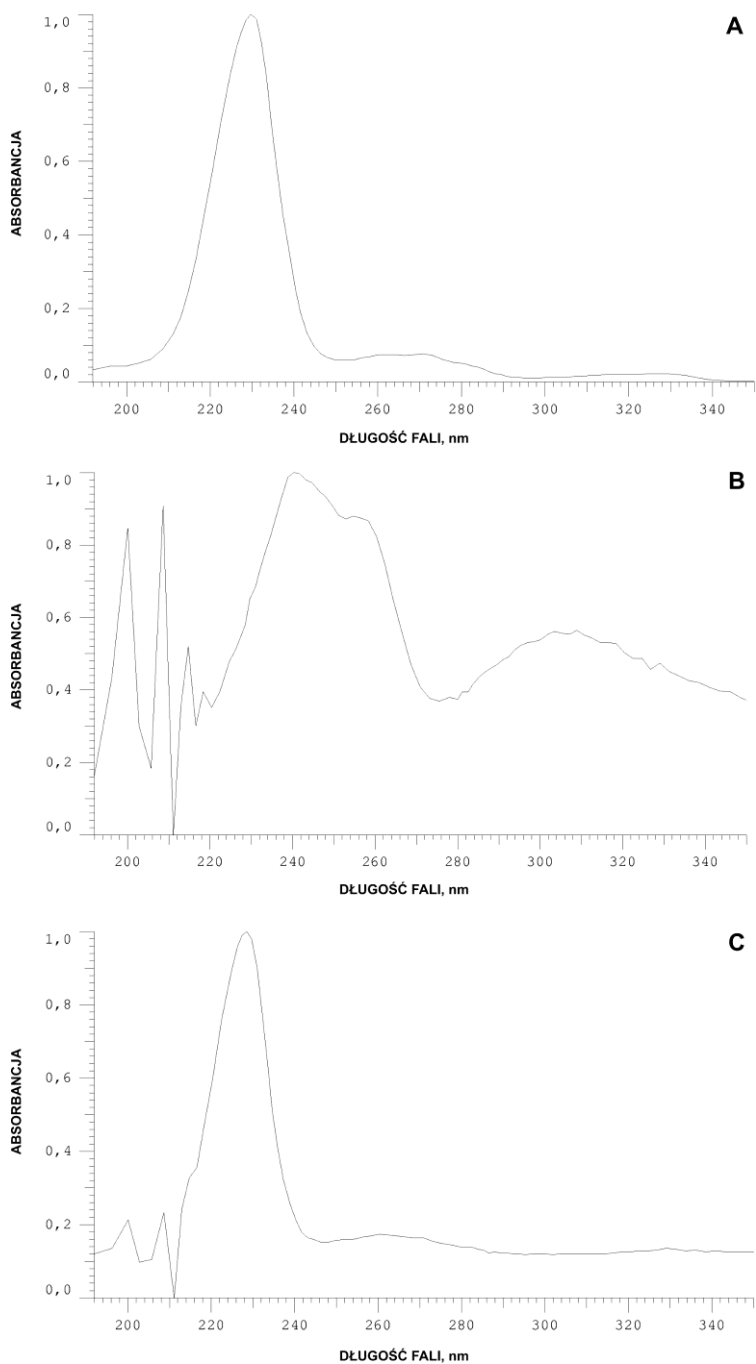
Tabela 2. Zmiany powierzchni pików produktów pośrednich rozkładu naproksenu pojawiających się w czasie prowadzenia hodowli kometabolicznych z glukozą (detekcja przy $\lambda=260$ nm)

Czas, dzień	Powierzchnia pików dla metabolitu 1 o czasie retencji RT = 3,28 min	Powierzchnia pików dla metabolitu 2 o czasie retencji RT = 2,05 min
7	23310	7110
14	-	4220
21	-	5180
28	-	3390
35	-	1580

Pierwszy identyfikowany produkt o czasie retencji RT = 3,28 min wykazano w pierwszym tygodniu badań. Obecności tego związku nie obserwowano w 14 dniu hodowli, co świadczy o biotransformacji tego intermediatu. Drugi metabolit o czasie retencji RT = 2,05 min pojawił się w pierwszym tygodniu, a w kolejnych następowało zmniejszenie jego stężenia w hodowli. Analiza uzyskanych widm i czasów retencji obserwowanych metabolitów wskazuje na ich podobną do naproksenu strukturę i właściwości fizykochemiczne (rys.2.), stąd sugeruje się, że szczep *P. stutzeri* przeprowadza biotransformację naproksenu do intermediatów o nieznacznie zmienionej budowie.

W hodowli z fenolem obserwowano zmniejszanie powierzchni pików naproksenu, co wskazuje na jego biotransformację. Podczas zastosowanych warunków rozdziału nie obserwowano dodatkowych pików, co prawdopodobnie może być związane z inną strukturą i właściwościami fizykochemicznymi powstających intermediatów.

Z dostępnej literatury wiadomo, że naproksen może być biotransformowany przez grzyby białej zgnilizny: *Trametes versicolor* i *Phanerochaete chrysosporium*. Grzyby białej zgnilizny syntetyzują enzymy ligninolityczne (lakazy, peroksydazy) oraz wewnątrzkomórkowy cytochrom P-450, które prawdopodobnie odgrywają rolę w biotransformacji naproksenu [17,23]. Podczas prowadzenia hodowli *Trametes versicolor* z naproksenem Marco-Urrea i in. [17] obserwowali pojawienie się dwóch metabolitów leku: 6-*O*-desmetylonaproksenu oraz 1-(6-metoksynaftalen-2-ilo) etanonu. Pierwszy metabolit powstawał w wyniku hydroksylacji z udziałem cytochromu P-450, natomiast drugi pojawiał się w układach z komercyjną lakazą. W trakcie dalszego prowadzenia hodowli oba metabolity zanikały. Na tej podstawie autorzy zasugerowali całkowity rozkład naproksenu pomimo, iż nie wykazano rozszczepienia pierścienia aromatycznego [17].



Rys. 2. Widmo naproksenu (A) oraz widma metabolitu 1 (B) i metabolitu 2 (C) uzyskane w trakcie analizy chromatograficznej z zastosowaniem detektora DAD

Rodarte-Morales i in. [23] w trakcie kometabolicznej hodowli *Phanerochaete chrysosporium*, w obecności glukozy jako substratu wzrostowego, obserwowali pojawienie się dwóch niezidentyfikowanych metabolitów naproksenu. Kluczowym enzymem biorącym udział w biotransformacji leku według autorów była peroksydaza manganowa [23]. Naproksen transformują również grzyby z rodzaju *Cunninghamella* (*Cunninghamella blakeslesna*, *Cunninghamella echinulata*, *Cunninghamella elegant*). Zhong i in. [30] wykazali, że w proces przekształcania naproksenu przez te grzyby zaangażowany jest układ enzymatyczny analogiczny do ssaczego systemu detoksykacji, o czym świadczą obecność 6-O-desmetylonaproksenu oraz siarczaniu 6-O-desmetylonaproksenu, produktów reakcji z udziałem odpowiednio cytochromu P-450 oraz transferazy siarczaniowej [30]. 6-O-desmetylonaproksen identyfikowano również w osadzie czynnym, prowadzonym w układzie kometabolicznym z naprokse-
nem i mlekiem w proszku oraz monosubstratowej w hodowli z naprokse-
nem szczepu *Aspergillus niger* [9,22]. W hodowli *Aspergillus niger* oznaczono również dwa wcześniej nieznanne metabolity naproksenu: 7-hydroksynaproksen oraz 7-hydroksy-6-O-desmetylonaproksen [9]. Na podstawie analizy dostępnej literatury można stwierdzić, że procesy przekształcania naproksenu prowadzą do jego pochodnych o strukturze aromatycznej i są prowadzone jedynie przez grzyby. Nie opisano dotychczas szczepów bakterii zaangażowanych w procesy biotransformacji/biodegradacji naproksenu jak również pełnego rozkładu tego związku w układach biologicznych. Przedstawiona praca jest pierwszym doniesieniem dotyczącym udziału czystego szczepu *Pseudomonas stutzeri* w procesach przekształcania naproksenu. Obecność enzymów rozszczepiających strukturę aromatyczną może sugerować pełny rozkład tego leku, jednak aby stwierdzić to jednoznacznie niezbędna jest identyfikacja powstających produktów pośrednich.

Projekt został sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji numer DEC-2013/09/B/NZ9/00244.

LITERATURA

- [1] BENOTTI M.J., TRENHOLM R.A., VANDERFORD B.J., HOLADY J.C., STANFORD B.D., SNYDER S.A., *Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water*, Environmental Science and Technology, 2009, Vol. 3, No. 43, 597-603.
- [2] BOROWSKI T., SIEGBAHN P.E.M., *Mechanism for catechol ring cleavage by non-heme iron intradiol dioxygenases: a hybrid DFT study*, Journal of the American Chemical Society, 2006, Vol. 39, No. 128, 12941-12953.
- [3] BOYD G.R., ZHANG S., GRIMM D.A., *Naproxen removal from water by chlorination and bio-film processes*, Water Research, 2005, Vol. 4, No. 39, 668-676.
- [4] BRADFORD M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*, 1976, Analytical Chemistry, Vol. 7, No. 72, 248-254.

- [5] CIDARIA D., DEIDDA F., BOSETTI A., *A rapid method for naphthalene dioxygenase assay in whole cell of naphthalene cis-dihydrodiol dehydrogenase blocked Pseudomonas fluorescens: screening of potential inducers of dioxygenase activity*, 1994, Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 41, No. 6, 689-693.
- [6] EL-SAYED A.B.D., EL-HAMEID SHALABY M., *Biological degradation of substrate mixtures composed of phenol, benzoate and acetate by Burkholderia capacia G4*, [w:] Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Facultat, Technischen Universitat Carolo-Wilhemina, Braunschweig 2003, 1-142.
- [7] FENG Y., KHOO H.E., POCH C.L., *Purification and characterization of gentisate 1,2-dioxygenases from Pseudomonas alcaligenes NCBI 9867 and Pseudomonas putida NCBI 9869*, 1999, Applied and Environmental Microbiology, Vol., 65, No. 3, 946-950.
- [8] HAIGLER B.E., GIBSON D.T., *Purification and properties of NADH-ferredoxin_{NAD} reductase, a component of naphthalene dioxygenase from Pseudomonas sp. strain NCIB 9816*, 1990, Journal of Bacteriology, Vol. 172, No. 1, 457-464.
- [9] HE A., ROSAZZA J.P.N., *Microbial transformations of S-naproxen by Aspergillus niger ATCC 9142*, 2003, Pharmazie, Vol., 58, No. 6, 420-422.
- [10] HEGEMAN G.D., *Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by Pseudomonas putida*, 1966, Journal of Bacteriology, Vol. 91, No. 3, 1161-1167.
- [11] HOU C.T., LILLARD M.O., SCHWARTZ R.D., *Protocatechuate 3,4-dioxygenase from Acinetobacter calcoaceticus*, 1976, Biochemistry, Vol. 15, No. 3, 582-588.
- [12] ISIDORI M., LAVORNA M., NARDELLI A., PARRELLA A., PREVITERA L., RUBINO M., *Ecotoxicity of naproxen and its phototransformation products*, 2005, Science of the Total Environment, Vol. 348, No. 1-3, 93-101.
- [13] KOWALSKI B., *Oznaczanie wybranych leków z różnych grup terapeutycznych w wodach powierzchniowych z zastosowaniem technik chromatograficznych*, [w:] Rozprawa doktorska, Politechnika Śląska, Gliwice 2011, 6-122.
- [14] LECHNER U., BAUMBACH R., BECKER D., KITUNEN V., AULIG G., SALKINOJA-SALONEN M., *Degradation of 4-chloro-2-methylphenol by an activated sludge isolate and its taxonomic description*, 1995, Biodegradation Vol. 6, No. 2, 83-92.
- [15] ŁURIE J.J., RYBNIKOVA A.J. *Chimiczeskij analiz proizvodstvennyh stocznyh vod* Goschimizat, Moskwa 1968.
- [16] MAMPEL J., PROVIDENTI M.A., COOK A.M., *Protocatechuate 4,5-dioxygenase from Comamonas testosteroni T-2: biochemical and molecular properties of a new subgroup within class III of extradiol dioxygenases*, 2005, Archives of Microbiology, Vol. 183, No. 2, 130-139.
- [17] MARCO-URREA E., PÉREZ-TRUJILLO M., BLÁNQUEZ P., VICENT T., CAMINAL G., *Biodegradation of the analgesic naproxen by Trametes versicolor and identification of intermediates using HPLC-DAD-MS and NMR*, 2010, Bioresource Technology, Vol. 101, No. 7, 2159-2166.
- [18] MILLER G.L., *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*, 1959, Analytical Chemistry, Vol. 31, No.3, 426-428.
- [19] MROZIK A., ŁABUŹEK S., PIOTROWSKA-SEGET S., *Changes in fatty acid composition in Pseudomonas putida and Pseudomonas stutzeri during naphthalene degradation*, 2005, Microbiological Research, Vol. 160, No2, 149-157.
- [20] NAIR C.I., JAYACHANDRAN K., SHASHIDHAR S., *Biodegradation of phenol*, 2008, African Journal of Biotechnology, Vol. 7, No. 25, 4951-4958.
- [21] NAKADA N., SHINOHARA H., MURATA A., KIRI K., MANAGAKI S., SATO N., TAKADA H., *Removal of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and endocrine-disrupting chemicals (EDCs) during sand filtration and ozonation at a municipal sewage treatment plant*, 2007, Water Research, Vol. 41, No. 19, 4373-4382.

- [22] QUINTANA J.B., WEISS S., REEMTSMA T., *Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by membrane bioreactor*, 2005, Water Research, Vol. 39, No. 12, 2654-2664.
- [23] RODARTE-MORALES A.I., FEIJOO G., MOREIRA M.T., LEMA M.J., *Biotransformation of three pharmaceutical active compounds by the fungus Phanerochaete chrysosporium in a fed batch stirred reactor under air and oxygen supply*, 2012, Biodegradation, Vol. 23, No. 1, 145-156.
- [24] SCHMIDT S., SCOW K., ALEXANDER M., *Kinetics of p-nitrophenol mineralization by a Pseudomonas sp.: effects of second substrates*, 1987, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 53, No. 11, 2617-2623.
- [25] SOSNOWSKA K., STYCZKO-GROCHOWIAK K., GOŁAS J., *Leki w środowisku – źródła przemiany, zagrożenia*, Krakowska Konferencja Młodych Uczonych, 2009, 395-404.
- [26] STANIER R.Y., INGRAHAM J.L., *Protocatechuic acid oxidase*, 1954, The Journal of Biological Chemistry, Vol. 210, No. 2, 799-808.
- [27] WEI M., ZHANG J.J., LIU H., ZHOU N.Y., *para-Nitrophenol 4-monoxygenase and hydroxyquinol 1,2-dioxygenase catalyze sequential transformation of 4-nitrocatechol in Pseudomonas sp. strain WBC-3*, 2010, Biodegradation Vol. 21, No. 6, 915-921.
- [28] YOUNG Z., SVEN-WE G., CARMEN G., *Carbamazepine and diclofenac: removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies*, 2008, Chemosphere, Vol. 73, No. 8, 1151-1161.
- [29] YU-CHEN L.A., REINHARD M., *Photodegradation environmental of common environmental pharmaceuticals and estrogens in river water*, 2005, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 24, No. 6, 1303-1309.
- [30] ZHONG Z.D.F., SUN L.L., HUANG H.H., *Microbial transformation of naproxen by Cunninghamella species*, 2003, Acta Pharmacologica Sinica, Vol. 24, No. 5, 442-447.
- [31] <http://www.drugbank.ca/>

BIOTRANSFORMATION OF NAPROXEN BY *PSEUDOMONAS STUTZERI* STRAIN

Pseudomonas stutzeri strain transformed 6 mg/l naproxen during 35 days. It was observed 32% transformation of drug in culture where naproxen was carbon and energy source. Whereas naproxen was eliminated of 37% and 59% in phenol and glucose cometabolic cultures, respectively. Moreover it was indicated enzymes take part in biotransformation of the drug: phenol monoxygenase, hydroxyquinol 1,2-dioxygenase and gentisate 1,2-dioxygenase. It was proposed that biotransformation of naproxen by *Pseudomonas stutzeri* proceeded by hydroxylation and aromatic ring cleavage.