

Paulina ROKICKA*, Agata MARKOWSKA-SZCZUPAK*,
Antoni W. MORAWSKI*

WPLYW DITLENKU TYTANU AKTYWOWANEGO ŚWIATŁEM WIDZIALNYM NA AKTYWNOŚĆ ENZYMATYCZNĄ GRZYBÓW PLEŚNIOWYCH

Badano wpływ ditlenku tytanu aktywowanego światłem widzialnym UV-VIS na aktywność enzymatyczną grzybów pleśniowych. W badaniach wykorzystano szczepy *Penicillium chrysogenum* (ZUT4, ZUT6, ZUT10) wyizolowane z powietrza piwnicy budynku mieszkalnego. Podłoże CYA wzbogacono dodatkiem 20 g TiO₂ P-25 (Evonik, Niemcy) na dm³ pożywki. W ciągu 6 dni prowadzenia hodowli, w temp. 25° C płytki inkubowano w świetle widzialnym UV-VIS oraz w ciemności. W drugim, czwartym i szóstym dniu hodowli mierzono średnicę kolonii, a w szóstym dniu hodowli oznaczano aktywność esteraz i katalaz. Dodatek ditlenku tytanu w stężeniu 20 g na dm³ podłoża był niewystarczający do pełnej eliminacji grzybów *Penicillium chrysogenum*. Spowodował jednak istotne zahamowanie aktywności wydzielanych przez grzyby enzymów. Aktywność esterazy spadła powyżej 51%, a katalazy 66 % aktywności wyjściowej (na podłożu kontrolnym).

1. WSTĘP

Zagrzybienie mieszkań oraz budynków użyteczności publicznej to zjawisko, z którym spotykamy się coraz częściej. Niedogrzewanie pomieszczeń, niewydajna wentylacja, błędy konstrukcyjne i projektowe oraz zły dobór materiałów budowlanych to główne przyczyny pojawiania się grzybów pleśniowych w domach [11,12]. Proces usuwania grzybów oraz ich zarodników znajdujących się w powietrzu jest trudny i długotrwały. Środki grzybobójcze mogą wpływać negatywnie na zdrowie ludzi i zwierząt, dlatego ich stosowanie jest ograniczone do powierzchni zewnętrznych budynków [5]. Z tego powodu poszukuje się skutecznych i bezpiecznych dla otoczenia preparatów o działaniu grzybostatycznym lub grzybobójczym. Jednym z nich może być tlenek tytanu

* Instytut Technologii Chemicznej Nieorganicznej i Inżynierii Środowiska, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

(IV). Jest to związek, wykorzystywany między innymi jako biały pigment w produkcji farb i lakierów, środków farmaceutycznych, artykułów spożywczych [8]. Dzięki swoim właściwościom fotokatalitycznym, które uaktywniają się pod wpływem wzbudzenia światłem o odpowiedniej częstotliwości, hamuje on rozwój bakterii, wirusów i prionów [2, 9]. Właściwości te, od kilku już lat, wykorzystywane są przy tworzeniu powłok antymikrobiologicznych i materiałów samoczyszczących.

Celem pracy było określenie wpływu ditlenku tytanu P-25 (Evonik, Niemcy) aktywowanego światłem widzialnym UV-VIS na wzrost i aktywność enzymatyczną grzybów pleśniowych. W badaniach wykorzystano grzyby pleśniowe z gatunku *Penicillium chrysogenum*.

2. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

W badaniach wykorzystano szczepy grzybów należące do gatunku *Penicillium chrysogenum* (ZUT4, ZUT6, ZUT10). Grzyby zostały wyizolowane z powietrza piwnicy budynku mieszkalnego. W doświadczeniach zastosowano metodę płytkową. Podłoże CYA (50 g agaru Czapka, 5 g ekstraktu drożdżowego, 0,01 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,005 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) wzbogacono $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ditlenku tytanu P-25 (Evonik, Niemcy). Podłoża niewzbogacone w TiO_2 stanowiły kontrolę w prowadzonych doświadczeniach. Na pożywki zaszczipiano zawieszony w roztworze soli fizjologicznej zarodniki grzybów. Do posiewu wykorzystywano zawiesiny o gęstości zarodników $10^6 \div 10^7 \cdot \text{cm}^{-3}$. Odpowiadało to wartości 5 w skali McFarlanda (BIOMÈRIEUX). Jedną część płytek Petriego zaszczipionych grzybami inkubowano w warunkach ciemności w temperaturze 25°C . Drugą część płytek umieszczono w cieplarni wyposażonej w źródło światła UV-VIS (4 żarówki halogenowe o mocy 50W, i natężeniu $120\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$, $\lambda=400\text{-}750 \text{ nm}$). W cieplarni utrzymywano temperaturę 25°C . W drugim, czwartym i szóstym dniu hodowli mierzono średnicę kolonii. Do pomiarów wykorzystywano licznik automatyczny wraz z oprogramowaniem umożliwiającym pomiar średnicy kolonii grzybni aCOLyte 7500 (Symbios, USA) z dokładnością 0,5 mm. Na podstawie uzyskanych wyników obliczano wskaźnik dziennego przyrostu promienia kolonii ($\text{mm} \cdot \text{dzień}^{-1}$). W tym celu wykorzystywano równanie regresji liniowej:

$$r = a \cdot t + b \quad (1)$$

gdzie: r — promień kolonii (mm); t — czas inkubacji (dzień); a — wskaźnik dziennego przyrostu promienia kolonii; b — wskaźnik opóźnienia wzrostu (log faza; λ).

W szóstym dniu hodowli grzybów *Penicillium chrysogenum* wykonano pomiary aktywności enzymatycznej. Oznaczenie aktywności katalazy wykonano metodą opisaną przez Brzezińską i Włodarczyk [1] w modyfikacji własnej. Oznaczono ilość nad-

tlenku wodoru H_2O_2 nie rozłożonego przez katalazę wydzielaną przez grzyby. Miareczkowanie przeprowadzono 0,02 M nadmanganianem potasu $KMnO_4$ w środowisku kwaśnym (1,5 M H_2SO_4). Aktywność katalazy podawano jako $\mu\text{mol g}^{-1}$ mokrej masy grzybni (m.m) min^{-1} . Oznaczenia całkowitej aktywności esteraz przeprowadzono według metody opisanej przez Leštan i in. [6] w modyfikacji własnej. Wykorzystano bezbarwny octan fluoresceiny, który pod wpływem enzymów wydzielanych przez grzyby ulegał hydrolizie do fluoresceiny - związku wykazującego właściwości fluoryzujące. Ilość fluoresceiny po dwugodzinnej inkubacji w temperaturze 25°C oznaczano spektrofotometrycznie przy długości fali 490 nm (Spektrofotometr Jasco V-650PC). Aktywność enzymatyczną grzybów wyznaczano z krzywych kalibracyjnych wykonanych dla pożywek kontrolnych i pożywek wzbogaconych ditlenkiem tytanu (co miało na celu eliminację błędów związanych z możliwością reakcji pomiędzy TiO_2 i octanem fluoresceiny). Krzywe wzorcowe wyznaczono dla standardów zawierających 0, 20, 50, 70, 150 μg czystej fluoresceiny. Wartość aktywności enzymatycznej esteraz podawano w μg fluoresceiny uwolnionej w ciągu godziny (h), przeliczonej na gram mokrej biomasy grzybni. Aktywność enzymatyczną porównano z wynikami otrzymanymi dla grzybów hodowanych na pożywkach kontrolnych, nie wzbogaconych w ditlenek tytanu. Wszystkie doświadczenia wykonano w trzech powtórzeniach. Dokonano analizy statystycznej otrzymanych wyników za pomocą programu Excel i Statistica, wersja 8,0. Analizę istotności różnic pomiędzy wzrostem grzybów na pożywce kontrolnej oraz uzupełnionej ditlenkiem tytanu wykonano testem ANOVA na poziomie istotności $p \leq 0,05$.

3. WYNIKI I DYSKUSJA

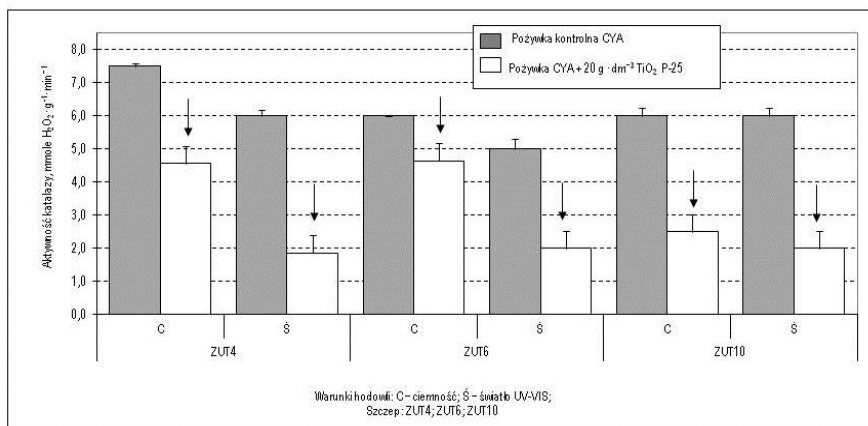
Dodatek ditlenku tytanu P-25 w stężeniu 20 g na dm^3 podłoża, spowodował znaczące zahamowanie wzrostu grzybni wszystkich badanych szczepów *Penicillium chrysogenum*, nawet wtedy gdy hodowle prowadzono w ciemności. Najmniejsze średnie dzienne przyrosty kolonii obserwowano w hodowlach prowadzonych na podłożach wzbogaconych w ditlenek tytanu, który aktywowano światłem widzialnym. Wszystkie zmiany średnich przyrostów kolonii były istotne statystycznie na poziomie istotności $\leq 0,05$ (tabela 1).

Różnice w aktywności katalazy wydzielanej przez grzyby *Penicillium chrysogenum*, należące do różnych szczepów, które rosły na podłożu kontrolnym CYA były małe. Światło UV-VIS powodowało nieznaczące obniżenie aktywności katalazy u szczepów ZUT4 i ZUT6 (rys. 1).

Tabela 1. Średnie dzienne przyrosty kolonii grzybów *Penicillium chrysogenum* uzyskane na podłożach różniących się stężeniem ditlenku tytanu P-25 w hodowlach prowadzonych w ciemności i świetle UV-VIS; \pm odchylenie standardowe

Pożywka	Szczep	Średnie dzienne przyrosty kolonii, mm · dzień ⁻¹	
		Warunki prowadzenia hodowli	
		Ciemność	Światło
kontrolna	ZUT4	3,92 \pm 0,24	3,31 \pm 0,41
	ZUT6	3,83 \pm 0,21	3,13 \pm 0,01
	ZUT10	3,47 \pm 0,03	3,17 \pm 0,12
wzbogacona w TiO ₂	ZUT4	2,83 \pm 0,72*	2,33 \pm 0,42*
	ZUT6	2,36 \pm 0,90*	2,11 \pm 0,05*
	ZUT10	2,08 \pm 0,30*	1,97 \pm 0,08*

*różnice statystycznie istotne pomiędzy pożywkami kontrolnymi i wzbogaconymi w TiO₂

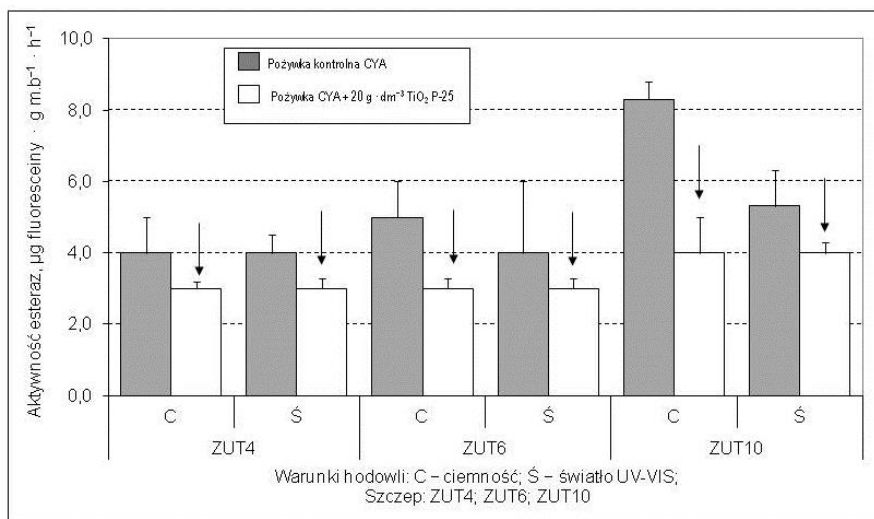


Rys. 1. Aktywność katalazy wydzielanej przez grzyby *Penicillium chrysogenum*, rosnące na pożywkach kontrolnych i pożywkach wzbogaconych w ditlenek tytanu P-25 w stężeniu 20 g · dm⁻³, inkubowanych w warunkach ciemności, w świetle UV-VIS, *strzałką zaznaczono różnice statystycznie istotne na poziomie istotności $p \leq 0,05$, pomiędzy pożywką kontrolną i wzbogaconą w 20 g · dm⁻³ TiO₂

W hodowlach prowadzonych w ciemności, dodatek ditlenku tytanu do podłoża CYA spowodował istotne obniżenie aktywności wydzielanej przez grzyby katalazy. Wynosiło ono od 22,50% – 58,33% (Rys. 1). Aktywacja ditlenku tytanu światłem UV-VIS spowodowała dalszy spadek aktywności katalazy. Średnio wyniósł on 65,78%. Wszystkie obserwowane różnice pomiędzy aktywnością enzymów wydzielanych przez grzyby rosnące na podłożach kontrolnych i wzbogaconych w ditlenek tytanu były istotne statystycznie.

Grzyby *Penicillium chrysogenum* rosnące na podłożu kontrolnym CYA różniły się aktywnością wydzielanych esteraz. Największą aktywnością charakteryzował się

szczep ZUT10. Podobnie jak w przypadku katalazy światło miało wpływ na obniżenie aktywności enzymatycznej grzybów (rys. 2).



Rys. 2. Aktywność esteraz wydzielanych przez grzyby *Penicillium chrysogenum*, rosnące na pożywkach kontrolnych i pożywkach wzbogaconych w ditlenek tytanu P-25 w stężeniu $20\text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, inkubowanych w warunkach ciemności, w świetle UV-VIS, *strzałką zaznaczono różnice statystycznie istotne na poziomie istotności $p \leq 0,05$, pomiędzy pożywką kontrolną i wzbogaconą w $20\text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ TiO_2

Dodatek do pożywki 20 g ditlenku tytanu P-25 spowodował zahamowanie aktywności esteraz wydzielanych przez wszystkie badane szczepy grzybów. Wynosił on $25,0\%$ – $51,81\%$. Odmienne niż w przypadku katalazy dodatkowa aktywacja ditlenku tytanu światłem UV-VIS nie spowodowała istotnych zmian w aktywności esteraz widzialnych przez *Penicillium chrysogenum* (rys. 2).

Badania nad wpływem ditlenku tytanu aktywowanego światłem prowadzono z wykorzystaniem trzech szczepów *Penicillium chrysogenum*. Wszystkie badane grzyby wyizolowano z powietrza. Stwierdzono, że badane szczepy nie różniły się znacznie w reakcji na światło UV-VIS oraz dodatek ditlenku tytanu w hodowlach prowadzonych na podłożu CYA. Uzyskane wyniki wskazują, że gatunek *Penicillium chrysogenum*, podobnie jak inne gatunki grzybów pleśniowych jest wrażliwy na światło UV-VIS. Może ono powodować inhibicję zarówno przyrostów kolonii jak i aktywności enzymów wydzielanych przez grzyby.

Przeciwdrobnoustrojowe działanie ditlenku tytanu aktywowanego światłem UV opisano już w 1985 roku. Za pomocą fotokatalizatora immobilizowanego na katodzie usunięto z wody komórki bakterii *Escherichia coli* oraz drożdży *Saccharomyces cerevisiae* [10]. Dalsze badania pozwoliły stwierdzić, że czynnikiem destruktywnym są głównie rodniki hydroksylowe $\text{OH}\cdot$, tworzące się w czasie reakcji fotokatalitycznych

indukowanych na cząsteczce ditlenku tytanu. Reakcje te mogą również zachodzić wewnątrz komórek grzybów, gdy nanocząsteczki ditlenku tytanu przedostaną się do ich wnętrza [4]. Mogą tym samym wpływać na funkcjonowanie systemów enzymatycznych.

Esterazy (EC 3.1) to ogólne określenie enzymów z grupy hydrolaz rozkładających wiązania estrowe w cząsteczkach tłuszczów z udziałem wody. Są enzymami niespecyficznymi substratowo, wydzielanymi zewnątrzkomórkowo [7]. Katalaza (EC 1.11.1.6) to enzym z grupy oksyreduktaz, który katalizuje proces rozkładu nadtlenu wodoru do wody i tlenu [1]. Białkowy charakter enzymów powoduje, że reagują one szybko i wyraźnie na różne czynniki środowiskowe, zarówno naturalne, jak wprowadzone sztucznie. Z tego powodu określenie aktywności enzymatycznej np. esteraz lub katalazy lub może być dobrym wskaźnikiem ogólnej żywotności grzybów pleśniowych oraz oddziaływania na nie takich związków jak: tlenki metali lub biocydy. Potwierdzają to również wyniki badań uzyskane przez Gilhama i Lehnera [3].

Dodatek ditlenku tytanu P-25 w stężeniu 20 g/ dm³ podłoża CYA, nie doprowadził do eliminacji grzybów *Penicillium chrysogenum*, nawet wówczas gdy prowadzono jego aktywację światłem. Wywołał jednak znaczące osłabienie aktywności życiowej grzybów i spadek aktywności enzymów. Jeśli weźmiemy pod uwagę fakt, że większość grzybów pleśniowych jest odporna na większość stosowanych czynników chemicznych i fizycznych, to uzyskane wyniki można uznać za zadowalające.

Badania wykonano z projektu MNiSW Nr 802/N-JAPONIA/2010/0

LITERATURA

- [1] BRZEZIŃSKA M., WŁODARCZYK T., *Enzymy wewnątrzkomórkowych przemian redoks (oksydoreduktazy)*, Acta Agrophysica, Rozprawy i Monografie, 2005, Vol. 3, 11–26.
- [2] CHEN F., YANG X., WU Q., *Antifungal capability of TiO₂ coated film on moist wood*, Building and Environment, 2009, Vol. 44, No. 5, 1088–1093.
- [3] GILHAM D., LEHNER R., *Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro*, Methods, 2005, Vol. 36, No. 2, 139–147.
- [4] GUILLARD C., BUI T.H., FELIX C., MOULES V., LINA B., LEJEUNE P., *Microbiological disinfection of water and air by photocatalysis*, Comptes Rendus Chimie, 2007, Vol. 11, No. 1–2, 107–113.
- [5] KARLSSON J., EKLUND B., *New biocide-free anti-fouling paints are toxic*, Marine Pollution Bulletin, 2004, Vol. 49, No. 5–6, 456–464.
- [6] LEŠTAN D., LEŠTAN M., CHAPELLE J.A., LAMAR R.T., *Biological potential of fungal inocula for bioaugmentation of contaminated soils*, Journal of Industrial Microbiology, 1996, Vol. 16, 286–294.
- [7] LLOYD G.I., MORRIS E., SMITH J.E., *A study of the esterases and their function in Candida lipolytica, Aspergillus niger and a yeast-like fungus*, Journal of General Microbiology, 1971, Vol. 63, 141–150.

- [8] LUBKOWSKI K., GRZMIL B., MARKOWSKA-SZCZUPAK A., TYMEJCZUK A., *Właściwości fotokatalityczne jako istotny parametr jakościowy pigmentów ditlenku tytanu*, Towaroznawcze Problemy Jakości, 2009, Vol. 1, 82–91.
- [9] MARKOWSKA-SZCZUPAK A., UFLIG K., MORAWSKI A.W., *The application of titanium dioxide for deactivation of bioparticulates: an overview*, Catalysis Today, 2011, Vol. 169, No. 1, 249–257.
- [10] MATSUNAGA T., TOMODA T., NAKAJIMA T., WAKE H., *Photochemical sterilization of microbial cells by semiconductor powder*, FEMS Microbiology Letters, 1985, Vol. 1, No. 1–2, 211–214.
- [11] NIELSEN K.F., HOLM G., UTTRUP L.P., NIELSEN P.A., *Mould growth on building materials under low water activities. Influence of humidity and temperature on fungal growth and secondary metabolism*, International Biodeterioration & Biodegradation, 2004, Vol. 54, 325–335.
- [12] ŻUKIEWICZ-SOBCZAK W., SOBCZAK P., IMBOR K., KRASOWSKA E., HOROCH A., WOJTYŁA A., PIĄTEK J., ZWOLIŃSKI J., *Zagrożenia grzybowe w budynkach i mieszkaniach – wpływ na organizm człowieka*, Medycyna Ogólna i Nauki o Zdrowiu, 2012, Tom 18, No. 2, 141–146.

INFLUENCE OF INDOOR LIGHT ACTIVATED TITANIUM DIOXIDE ON ENZYMATIC ACTIVITY OF *PENICILLIUM CHRYSOGENUM*

The influence of visible light activated titanium dioxide (P-25) on enzymatic activity of three strains *Penicillium chrysogenum* was investigated. The agar plate method was used and 20 g of P-25 (from Evonic factory, Germany) on each media litter were added. One part of the plates was incubated in the dark, while another part was everyday exposed to natural visible light. The plates were incubated at 25 °C for 6 days. Colony diameters were measured after 2, 4 and 6 days. Esterase's and catalase activity was determined. The study has revealed that the concentration of 20 g TiO₂ dm⁻³ is not sufficient for elimination of *Penicillium chrysogenum*. The results indicates significant inhibitory influence of titanium dioxide on enzymatic activity. In comparison with controls, addition of titanium dioxide to CYA media resulted in 51% decreases of esterase's activity and 66% decrease of catalase activity.