

# Niektóre aspekty biodegradacji jednopierścieniowych i wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA)

*Maria J. Król*

*Zakład Mikrobiologii Rolniczej, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa  
Osada Pałacowa, 24-100 Puławy*

**Słowa kluczowe:** węglowodory aromatyczne, mikroorganizmy,  
mineralizacja

## Ropa naftowa i jej frakcje

---

Wiele uwagi poświęca się problemowi zanieczyszczenia środowiska związkami organicznymi, do których również zalicza się substancje ropopochodne. Intensywny rozwój transportu powoduje stale rosnące zapotrzebowanie na paliwa i wiążącą się z tym konieczność ich magazynowania, przetwarzania i dystrybucji. Szacuje się, że ze wszystkich awarii i wypadków prowadzących do skażenia gleby i wód gruntowych niemal 40% to zanieczyszczenia paliwami, olejami lub smarami.

Ropa naftowa jest obecnie najważniejszym surowcem do produkcji paliw płynnych, do syntezy bardziej złożonych związków chemicznych i całego szeregu półproduktów [33]. Największą i najważniejszą grupę produktów naftowych stanowią paliwa: benzyna do silników z zapłonem iskrowym, nafta do silników odrzutowych, olej napędowy do silników Diesla. Olej napędowy stanowi złożoną, wieloskładnikową mieszaninę związków, wśród których są węglowodory n-alifatyczne i ich rozgałęzione analogi z charakterystycznymi dla oleju napędowego izoprenoidami: pristanem, fytanem i norpristanem. Kolejną grupę stanowią węglowodory cykloparafinowe (nafteny). Bardzo istotnymi składnikami oleju napędowego są węglowodory aromatyczne: alkilobenzeny, alkilotolueny, indany, tetraliny, naftalen, metylonaftaleny, fenantren i metylofenantreny. Wśród wymienionych grup węglowodorów największy udział mają monoaromaty [44].

## Rozmieszczenie składników skażenia ropopochodnego w glebie

---

W środowisku glebowym, poszczególne składniki zanieczyszczenia, mogą się mieszać z powietrzem glebowym i w tej formie występują głównie lotne węglowodory alifatyczne i aromatyczne. Cięższe frakcje ropy naftowej, ulegają adsorpcji na powierzchni cząstek glebowych. Najgroźniejsza jest ta grupa związków, która znajduje się w roztworze glebowym, gdyż stanowi potencjalne zagrożenie dla wód gruntowych. Wody opadowe, w których rozpuszczają się głównie węglowodory aromatyczne powodują, że te najbardziej toksyczne składniki ropy naftowej są wmywane do głębszych warstw gleby, a ostatecznie do wód podziemnych, stanowiących często ujęcia wody pitnej. Wiele związków zidentyfikowanych w skażeniach ropopochodnych jest potencjalnie toksycznych i mutagennych [19].

## Zwiększenie stopnia mineralizacji WWA

---

### Pierwiastki biogenne

Związki ropopochodne są zbudowane głównie z węgla i wodoru, a tylko część z nich zawiera stosunkowo małe ilości azotu. Dlatego w tak skażonej glebie znacznie wzrasta stosunek C : N. Występujący w obfitości węgiel nie może być w pełni wykorzystany przez mikroorganizmy, ponieważ brak jest dostatecznych ilości azotu i fosforu, niezbędnych do syntezy białka, kwasów nukleinowych i związków wysokoenergetycznych. Niedobór tych dwóch istotnych pierwiastków biogennych nie pozwala na zużywanie węgla jako źródła energii i jego przekształcanie w masę bakteryjną. Wiele badań wskazuje na konieczność uzupełniania w skażonym środowisku azotu i fosforu. Związki azotu i fosforu dostarcza się najczęściej w postaci roztworu wodnego, stosując perkolację gleby [7] lub w postaci powszechnie używanych w rolnictwie mieszanek nawozowych. Jednak należy pamiętać, że bardzo istotne jest tu dobranie prawidłowej dawki substancji odżywczych. Ich optymalne stężenie zapewnia maksymalną degradację zanieczyszczenia, lecz nie powoduje powstawania toksycznych związków, takich jak na przykład azotyny, czy nitrozoaminy. Obecność takich niebezpiecznych produktów najczęściej wynika z wprowadzenia do gleby nadmiernych ilości azotanów. Przy ograniczonym dostępie tlenu mogą z nich powstawać na drodze chemicznej lub biologicznej związki toksyczne.

### Dostarczanie akceptorów elektronów

Mineralizacja związków organicznych jest efektywniejsza w warunkach tlenowych. Tlen jest wbudowywany w strukturę związku w reakcji katalizowanej przez oksygenazy. W rezultacie związek staje się bardziej podatny na dalszą transformację. Tlen stanowi też końcowy akceptor elektronów w łańcuchu oddechowym.

Jego zawartość w skażonym środowisku można zwiększyć różnymi metodami [7]. Jedną z nich jest perkolacja napowietrzoną wodą. Woda nasycona tlenem, często dodatkowo wzbogacana składnikami odżywczymi, przesiąka swobodnie w głąb skażonej gleby, oddając stopniowo tlen, i miesza się z wodami gruntowymi. Inna technika polega na wtłaczaniu sprężonego powietrza. Najczęściej jednak stosuje się bio-wentylację, w wyniku której następuje usunięcie lotnych frakcji zanieczyszczenia (wentylacja) i przyśpieszenie rozkładu cięższych (właściwa biowentylacja). W fazie wentylacji powietrze wtłacza się szybkim strumieniem, by maksymalnie zwiększyć parowanie lotnych węglowodorów. Podczas biowentylacji powietrze zostaje dostarczone w wolniejszym tempie w celu zapewnienia korzystnego bilansu tlenowego dla procesów aerobowej biodegradacji.

Zamiast tlenu można stosować również  $H_2O_2$ , który ma prawie siedmiokrotnie większą rozpuszczalność w wodzie niż tlen [7], ale w wyższych stężeniach jest toksyczny.

Ostatnio coraz częściej dostarcza się do środowiska alternatywne w stosunku do tlenu akceptory elektronów, co stymuluje beztlenowe procesy rozkładu organicznych zanieczyszczeń. W tych warunkach mikroorganizmy mogą mineralizować większość węglowodorów alifatycznych i aromatycznych.

### Zwiększanie biodostępności zanieczyszczenia

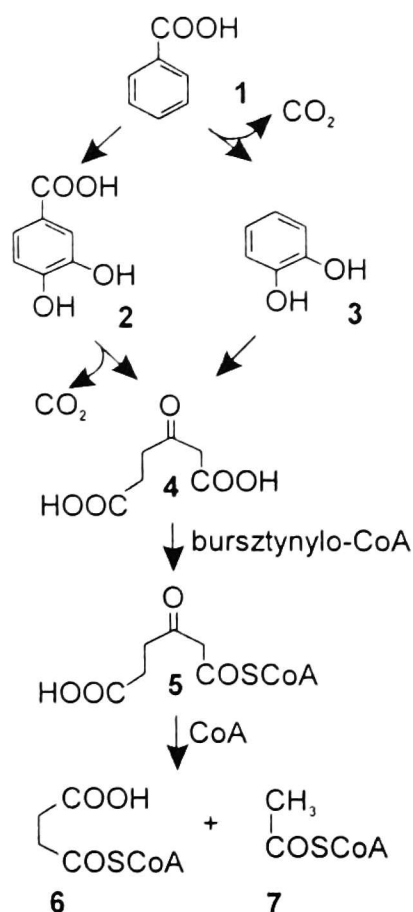
Słaba rozpuszczalność węglowodorów w wodzie oraz ich adsorbowanie na cząsteczkach glebowych powoduje znaczne zmniejszenie ich biodostępności, co istotnie ogranicza proces bioremediacji [10]. Niska efektywność degradacji tych związków nie wynika ze zbyt małej aktywności metabolicznej mikroorganizmów, ale z niewielkiej dostępności substratów, tj. składników zanieczyszczenia [46]. Zastosowanie detergentów powoduje desorpcję i zwiększa rozpuszczalność związków hydrofobowych w fazie wodnej, a w konsekwencji zwiększa tempo biodegradacji. Wprowadzenie syntetycznych detergentów może okazać się toksyczne dla środowiska. Lepszymi właściwościami charakteryzują się nietoksyczne biosurfaktanty produkowane przez endogenną mikroflorę zasiedlającą skażoną glebę. Z ostatnich badań wynika, że alasan otrzymany z *Acinetobacter radioresistens* szczep KA53, w dawce  $500 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ , zwiększał rozpuszczalność w wodzie kilku węglowodorów i dzięki temu powodował również dwukrotnie szybszą mineralizację fluorantenu i fenantrenu przez *Sphingomonas paucimobolis* szczep EPA505 [2].

## Mineralizacja węglowodorów aromatycznych

### Benzen – węglowodór jednopierścieniowy i jego pochodne

W środowisku glebowym benzen występuje w bardzo małych ilościach. Przede wszystkim znajduje się on w ropie naftowej, w maksymalnej ilości do  $0,4 \text{ g} \cdot 1000 \text{ cm}^{-3}$ , i w benzynie. Wulkany i palące się lasy przyczyniają się do pojawienia się benzenu w środowisku. Benzen jest także znajdowany w dymie papierosowym.

Biodegradacja samego benzenu została przeprowadzona przez szczep *Pseudomonas* sp. JS150 w mieszkankach związków aromatycznych z fenolem i toluenem oraz z węglowodorami aromatycznymi [14]. Szczep ten zawiera niespecyficzną dioksygenazę toluenową podobną do tej, którą znaleziono w szczepie *Pseudomonas putida*, dzięki której następuje degradacja benzenu i fenoli. Ostatnio stwierdzono, że degradacja benzenu może być także przeprowadzona przez halofilne bakterie w warunkach tlenowych [37].



**Rysunek 1.** Konwencjonalny schemat cyklu utleniania benzoianów przez bakterie *via ortho* katecholu i przez grzyby *via*  $\beta$ -ketoadypinianu. 1 – benzoian; 2 – protokatecholan; 3 – katechol; 4, 3 – oksoadypinian; 5, 3 – oksoadipilo-CoA; 6 – bursztynnylo-CoA; 7 – acetylo-CoA [13]

Według Geschera i in. [13] konwencjonalny cykl utleniania benzoianów przez bakterie *via ortho* katecholu i przez grzyby *via*  $\beta$ -ketoadypinianu, w którym są wytwarzane jako produkty pośrednie protokatecholanu przedstawia rysunek 1. Cyklu utleniania benzoianów *via ortho* katecholu lub *via* protokatecholanów nie stwierdzono np. u proteobakterii *Azoarcus evansii* [33]. Z grupy bakterii wolno żyjących, wiążących wolny azot takie bakterie, jak *Azoarcus* (np. *A. toluvorans*, *A. toluclasticus*), *Burkholderia kururiensis* oraz bakterie symbiotyczne *Bradyrhizobium* i *Mezorhizobium* mogą rozkładać różne związki benzenowe, ale w warunkach denitryfikacji [49, 13].

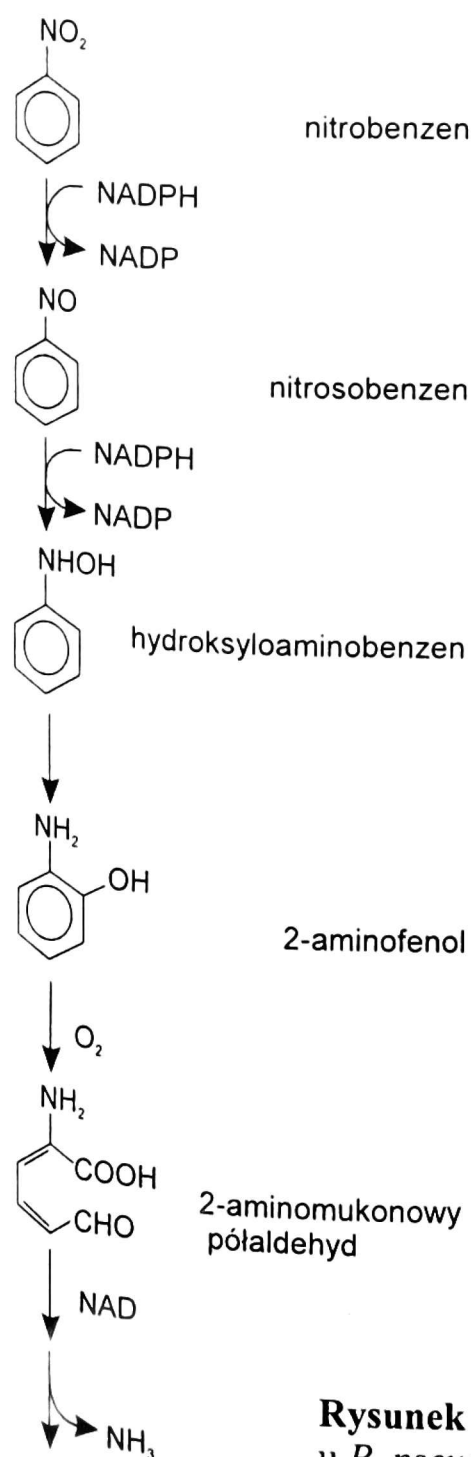
Z bakterii Gram-dodatnich, termofilny szczep *Bacillus stearothermophilus* PK1 wykorzystuje związki benzoesowe, 3-hydroksybenzoesany jako jedyne źródło węgla i energii natomiast nie rośnie na 2 i 4-hydroksybenzoianach, 2,3- i 3,4-dihydroksybenzoianach i katecholu [24].

Znacznie większe znaczenie niż benzen mają jego homologi oraz ich pochodne, np. nitrobenzen. Nitrobenzen jest jedną z toksycznych pochodnych benzenu, którego emisja do środowiska może być wysoka, szczególnie z fabrycznych osadów ściekowych, ponieważ jest on używany przy produkcji poliuretanów,



jako rozpuszczalnik w przemyśle rafineryjnym, przy produkcji celulozy, przy wytwarzaniu różnych związków organicznych i innych.

W glebie skażonej nitrobenzenem Fletcher i McFarlane stwierdzili, że system korzeniowy soi (*Glycine max*) pobiera w ilości  $0,02-100 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$  i akumuluje aż do 80% nitrobenzenu [11]. Biodegradacja tego związku jako jedynego źródła węgla i energii w warunkach tlenowych może być przeprowadzona przez *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, który był wyizolowany z wody zanieczyszczonej nitrobenzenem przez Nishino i Spain [38]. Autorzy ci na podstawie uzyskanych związków pośrednich przy mineralizacji nitrobenzenu zaproponowali cykl biodegradacji tego związku (rys. 2). W pierwszym etapie nitrobenzen jest redukowany do nitrosobenzenu, a następnie do hydroksyloaminobenzenu. W warunkach tlenowych lub beztlenowych hydroksyloaminobenzen jest katalizowany w reakcji enzymatycznej do 2-aminofenolu, który po rozszczepieniu pierścienia aromatycznego przechodzi w półaldehyd



2-aminomukonowy z uwolnieniem amoniaku. Inne gatunki bakterii z rodzaju *Pseudomonas*, jak stwierdzili Nishino i Spain, np. *P. putida*, *P. pickettii*, *P. cepacia*, *P. mendocina* nie są zdolne do wzrostu w obecności nitrobenzenu jako jedynego źródła węgla [38]. Bakterie te rosną tylko przy dodaniu do pożywki z nitrobenzenem glukozy lub argininy.

Szczep *P. pseudoalcaligenes* JS45, u którego He i Spain [15] odkryli nową deaminazę 2-aminomukonową również jest zdolny do biodegradacji nitrobenzenu.

Smith i Rosazza [43] badając zdolność metabolizowania nitrobenzenu i jego związków pośrednich, nie stwierdzili fenolowych metabolitów w pożywkach z następującymi mikroorganizmami: *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium chrysogenum*, *Cunninghamella blakesleeana*, *Cunninghamella bainieri*, *Gliocladium deliquescens*, *Streptomyces* sp., *Streptomyces rimosus*, *Rhizopus stolonifer*, *Rhizopus lunata* i *Helicostylum piriforme*.

Davies i in. [8] badali degradację nitrobenzenu i wytworzone podczas jego mineralizacji metabolity w fabrycznych osadach

**Rysunek 2.** Proponowany schemat cyklu biodegradacji nitrobenzenu u *P. pseudoalcaligenes* przez Nishino i Spain [38]

ściekowych, z których wyizolowano cztery rodzaje bakterii *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* i drożdże *Rhodotorula*. We wszystkich doświadczeniach z tymi bakteriami, występowały one w stężeniu  $18 \times 10^8$  komórek na  $\text{cm}^3$ . W czasie degradacji nitrobenzenu, kontrolowano temperaturę i oddychanie, mierzone aparatem Warburga oraz badano wytworzone metabolity: anilinę i fenol. Oddychanie bakterii było hamowane przy stężeniu nitrobenzenu wynoszącym 100 i 200  $\text{mg} \cdot 1000 \text{ cm}^{-3}$ . W przybliżeniu około 9–10 mg nitrobenzenu na 1000  $\text{cm}^3$  osadów ściekowych było biodegradowane w ciągu 6 dni.

Park i Kim [39] znaleźli u *Pseudomonas putida* dwa plazmidy pNB1 i pNB2 na których zlokalizowane były geny *nbzA*, *nbzC* i *nbzD* odpowiedzialne za wytwarzanie enzymów: nitroreduktazy benzenowej, 2-aminofenolowej 1,6-dioksygenazy, 2-aminomukonowej 6-półaldehydowej dehydrogenazy i 2-aminomukonowej deaminazy uczestniczących w degradacji nitrobenzenu. Inny szczep *Pseudomonas putida* TW3 również zawiera komplet genów, dzięki czemu jest zdolny do mineralizacji 4-nitrotoluenu przez cykl 4-nitrobenzoesanów [17].

Szczep bakterii *Comamonas* sp. JS765 pod wpływem 1,2-dioksygenazy mineralizuje nitrobenzen, jako jedyne źródło węgla i energii, który przechodzi w nietrwałą formę nitrohydrodiolu, a potem spontanicznie rozkłada się do formy katecholu i azotanów [29].

### Węglowodory dwu- i trójpierścieniowe: naftalen, antracen i fenantren

W nieskażonej glebie istnieje zwykle pewien potencjał biodegradowujący węglowodory, ponieważ niektóre z tych związków są obecne w środowisku glebowym. Stanowią one składniki biomasy roślinnej, np. n-alkany wchodzące w skład wosków. Węglowodory są najefektywniej mineralizowane przez drobnoustroje, które wykorzystują je jako substrat podstawowy, stanowiący źródło węgla i energii niezbędny dla ich wzrostu. W glebie liczebność drobnoustrojów wyspecjalizowanych w biodegradacji węglowodórów jest jednak niewielka i stanowi zwykle 0,01–0,1% ogólnej liczby bakterii.

W glebach dobrze przewietrzanych o dużym natlenieniu najszybciej są rozkładane antracen, fenantren, piren i acenaften, wolniej są utleniane chryzen, perylen, 1,2-benzantracen, 1,2-benzopiren, 1,2,3,4-dibenzantracen i 1,2,5,6-dibenzantracen [1].

Biodegradacja przez mikroorganizmy wielopierścieniowych węglowodórów aromatycznych (WWA), takich jak naftalen, antracen, fenantren i piren, jest dobrze udokumentowana [6]. Węglowodory aromatyczne są wykorzystywane jako źródło węgla i energii głównie przez *Mycobacterium*. Ostatnio doniesiono, na podstawie identyfikacji związków pośrednich, o degradacji antracenu jako jedyne źródła węgla przez *Mycobacterium* szczep LB501T via nowego cyklu przez kwas *o*-ftalowy [16].

Grzyby z gatunków: *Cunninghamella elegans*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Syncephalastrum*

*racemosum* mają również zdolność utleniania antracenu, naftalenu, fenantrenu i pirenu [40]. Jednak z wykorzystywania antracenu [42], fenantrenu [42] i naftalenu [5, 41] znane są przede wszystkim bakterie z rodzaju *Pseudomonas* takie gatunki jak: *P. fluorescens*, *P. putida* i *P. saccharofila* oraz *P. stutzeri*, wiążący wolny azot w obecności różnych substratów będących źródłem węgla i energii [27, 48]. Mueller i in. [36] wyizolowali z gleby szczep bakterii *P. paucimobilis*, który był zdolny do rozkładu fluorantenu. Fluoranten i piren mogą być również metabolizowane przez *P. putida* i *P. aeruginosa* [45]. Mieszanka szczepów bakterii: *P. paucimobilis*, *P. vesicularis* i *Alcaligenes denitrificans* jest zdolna do degradacji fenantrenu, fluorenu i fluorantenu.

Strefa korzeniowa roślin jest miejscem, gdzie jest znacznie wyższa niż w glebie obfitość substratów pierwotnych dostarczanych przez wydzieliny korzeniowe. W tej strefie obserwuje się zwiększone tempo bioremediacji organicznych zanieczyszczeń w porównaniu z glebą nieryzosferową. Wiąże się to przede wszystkim z aktywnością metaboliczną mikroflory licznie zasiedlającą ryzosferę. Do tych bakterii między innymi należą ryzobakterie z rodzaju *Azospirillum*, wiążące wolny azot, które zalicza się do fakultatywnych endofitów zdolnych do kolonizacji zarówno zewnętrznej powierzchni korzenia, jak i wewnętrznej przestrzeni międzykomórkowej, korzystnie oddziałujących na wzrost i rozwój roślin. W dostępnej literaturze brakuje jednak publikacji o rozkładzie węglowodorów aromatycznych przez *Azospirillum* sp., znaleziono jedynie jedną pracę na temat rozkładu fenolu i benzoesanów przez te bakterie [3] oraz publikację, w której autorzy podają o wyizolowaniu z gleby zanieczyszczonej smołą i olejem napędowym *Azospirillum brasilense* ZM-87 [31]. Król i Perzyński [26] stwierdzili, że szczepy bakterii *Azospirillum* spp. wyizolowane z endoryzosfery jęczmienia jarego, kukurydzy i wydmuchrzycy piaskowej wiązały wolny azot wykorzystując naftalen, antracen i fenantren [27, 48]. Wykazano, że redukcja acetyleny szczepów *P. stutzeri* z wymienionymi wyżej węglowodorami była niższa w porównaniu ze szczepami *Azospirillum* spp., pomimo stwierdzenia u nich obecności genu dioksygenazy katecholowej odpowiedzialnego za degradację tych węglowodorów [27, 41, 48].

Zdolność do wykorzystywania przez mikroorganizmy węglowodorów jako źródła węgla i energii, warunkuje informacja genetyczna kodująca syntezę enzymów uczestniczących w ich przemianach do acetylo-CoA. Najczęściej jest ona zlokalizowana na pozagenomowych elementach – plazmidach lub w genomie bakterii. Dioksygenaza katecholowa jest głównym enzymem odpowiedzialnym za przekształcanie węglowodorów aromatycznych, katalizuje ona pierwszy etap ich oksydacji.

Do tej pory zbadano i opisano najwięcej operonów takich jak *pah*, *nag*, *nah*, *tod*, *bph*, *dox*, które uczestniczą w mineralizacji węglowodorów dwupierścieniowych, przede wszystkim naftalenu i bifenyłu. Naftalen był najczęściej wybieranym związkiem modelowym dla badania degradacji WWA, ponieważ jest on najlepiej rozpuszczalnym w wodzie węglowodorem w stosunku do innych węglowodorów aromatycznych i w związku z tym łatwiej ulega degradacji przez mikroorganizmy [6, 8].



Wśród bakterii z rodzaju *Pseudomonas* scharakteryzowano szczepy, które mają informację genetyczną dla enzymów uczestniczących w degradacji naftalenu i toluenu. Wiadomo, że informacja ta zlokalizowana jest na plazmidach, np. *P. putida* PpG7 – plazmid NAH7 [42], *P. putida* PaW 736 – plazmid NCIB9816 [47] i *P. fluorescens* 5R – plazmid pKA1 [32]. Sanseverino i in. [42] wykazali, że plazmid NAH7 zawiera geny kodujące enzymy uczestniczące w szlaku degradacji naftalenu, które mogą także brać udział w mineralizacji fenantrenu i antracenu.

Natomiast dioksygenaza naftalenowa katalizuje pierwszy etap reakcji w tlenowej mineralizacji naftalenu przez szczep *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4 oraz, jak wykazali w swoich badaniach Lee i Gibson [28], utlenia etylobenzen do R-1-fenylo-1,2-etanediolu w reakcjach dihydroksylacji (rys. 4). W reakcji tej jednym z metabolitów jest styren i 2-hydroksyaceto-fenon.

Modelowym przykładem operonu związanego z bakteryjnym metabolizmem naftalenu do salicylanu jest *nah*, zlokalizowany na plazmidzie NAH7 u szczepu *Pseudomonas putida* PpG7. Jedne z pierwszych badań mineralizacji naftalenu i ustalenia cyklu jego przemian i związków pośrednich przeprowadzili Davies i Evans w 1964 roku [8]. Między innymi wykazali oni, że 2-hydroksychromian-2-karboksyłowy (HCCA) izomeruje w wodzie w sposób spontaniczny przy neutralnym pH.

Istnieją dwie drogi rozkładu dwupierścieniowych węglowodorów aromatycznych. W pierwszym etapie następuje aktywacja naftalenu do salicylanu. Następnie salicylan jest przekształcany do katecholi i dalej następuje rozszczepienie pierścienia typu orto lub meta. Następnie związki są włączane do cyklu kwasów trójkarboksyłowych. Jeden ze schematów cyklu mineralizacji naftalenu u *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4, G7 zaproponowany przez Wacketta przedstawiono na rysunku 3 [9]. Z ostatnich publikacji dotyczących szlaku rozkładu naftalenu z wykorzystaniem gentisanu (inaczej 2,5-dihydroksybenzoesu), wynika, że nie jest to powszechna droga bakteryjnego katabolizmu związków aromatycznych. Bardziej wydajny jest cykl przez związki katecholowe (rys. 3). Mimo to gentisat i jego pochodne służą za kluczowe związki pośrednie powstające podczas degradacji wielu aromatów w warunkach tlenowych, takich jak 3-hydroksybenzoesan, podstawione fenole i salicylany.

W wyniku licznych badań i analiz szlaków degradacji węglowodorów aromatycznych przez *Sphingomonas aromaticivorans* wykazano istnienie wspólnych enzymów uczestniczących w początkowym etapie rozkładu naftalenu i bifenylu. Uczestniczą w nim enzymy kodowane przez geny zlokalizowane na operonie *bph*, odpowiadające za degradację bifenylu i polichlorowanych bifenoli, które stanowią powszechne źródło zanieczyszczeń środowiska.

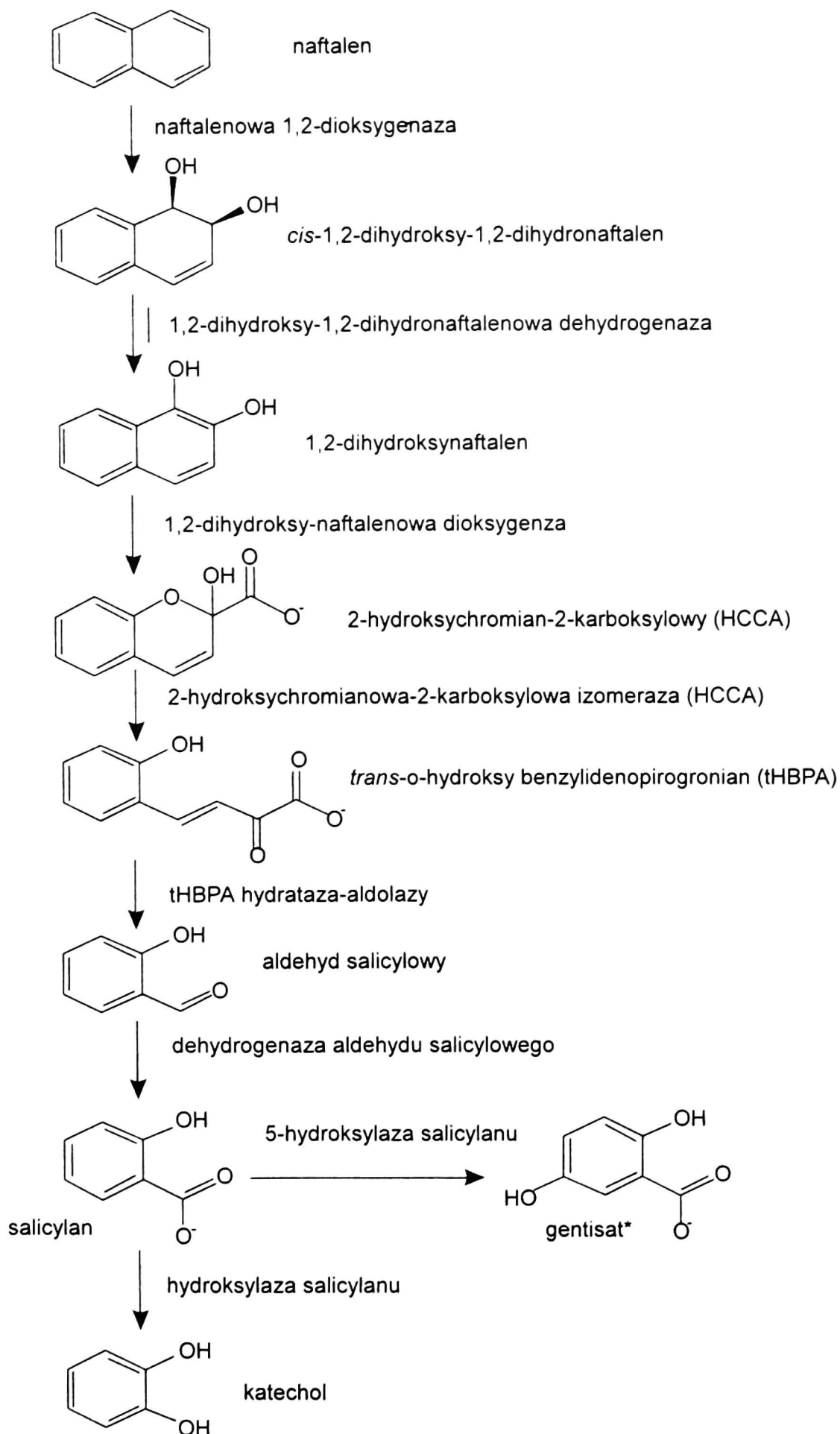
W przypadku fenantrenu, trójcyklicznego węglowodoru aromatycznego, istnieją również dwa szlaki mineralizacji. Jeden cykl rozkładu obejmuje oksydację kwasu 1-hydroksy naftolinowego do 1,2-dihydroksynaftalenu, który później ulega degradacji przez szlaki rozkładu naftalenu do kwasu salicylowego, włączanego w cykl przemian metabolicznych. Drugi cykl rozkładu tego związku obejmuje reakcje rozszczepienia



pierścienia kwasu 1-hydroksy naftolinowego i dalszy metabolizm przez szlaki rozkładu ftalatu (benzan-1,2-dikarboksyłowy). W pierwszym etapie tego cyklu ftalat ulega dihydroksylacji przez dioksygenazę ftalową do 4,5-dihydro-4,5-dihydroksyftalenu (cis-ftalowy dihydrodiol). W drugim etapie uczestniczy dehydrogenaza, która usuwa dwa elektrony i dwa wodory z cis-ftalowego dihydrodiolu i powstaje 4,5-dihydroksyftalat oraz NADH. Jedna z dwóch grup karboksylowych jest usuwana przez 4,5-dihydroksyftalową dekarboksylazę i powstaje protokatechina, czyli kluczowy produkt powstający w metabolizmie związków aromatycznych [18]. U *Burkholderia cepacia* DBO1 np. szlak rozkładu węglowodorów przebiega zgodnie z mechanizmem rozszczepienia typu orto, w wyniku którego powstające produkty pośrednie włączane są w szlak  $\beta$ -ketoadypinowy, a następnie w cykl kwasów trójkarboksylowych.

Kiyohara i in. [25] udowodnili, że naftalen i fenantren mają wspólny początkowy etap rozkładu. Wspólny szlak rozkładu fenantrenu i naftalenu został zaobserwowany u bakterii *Pseudomonas putida* OUS82, która zawiera geny kodujące enzymy biorące udział w szlaku degradacji tych związków, zorganizowane w operon *pah*. Szczep ten może wykorzystywać naftalen i fenantren jako jedyne źródło węgla i energii. Enzymy uczestniczące w degradacji tych związków charakteryzują się szeroką specyficznością substratową. Gen *pahA* koduje dioksygenazę PahA, która jest pierwszym enzymem drogi przemian WWA do odpowiednich cis-dihydrodioli. Drugi enzym dehydrogenaza PahB, kodowana przez gen *pahB*, przekształca produkty PahA do odpowiednich dioli. U *Pseudomonas putida* OUS82 w obu drogach rozkładu naftalenu do salicylanu i fenantrenu do kwasu naftalenowego pośredniczy pojedynczy zestaw enzymów kodowanych przez geny zgrupowane na chromosomie lub plazmidzie. Niektóre szczepy z rodzaju *Beijerinckia*, jak zbadali wcześniej Kiyohara i in. [25] po wykryciu plazmidów *pKG1* i *pKG2* u tych bakterii, są zdolne do utleniania fenantrenu.

Natomiast dość powszechnie stwierdza się zdolność do metabolizowania węglowodorów na drodze kometabolicznej [4], zarówno w warunkach tlenowych, jak i bez-tlenowych. Węglowodór nie stanowi w tym przypadku źródła węgla i energii, jest natomiast kosubstratem. Jego przekształcenie jest katalizowane przez enzymy uczestniczące w przemianach substratu pierwotnego, charakteryzujące się jednocześnie bardzo małą specyficznością dla otrzymanego substratu, np. autotroficzne bakterie nityfikacyjne (*Nitrosomonas europaea*) przy udziale monooksygenazy amonowej są zdolne do metabolizowania takich substratów, jak fluorek metylowy i dietylo-eter do formaldehydu i metanolu. Te same bakterie mogą metabolizować siarczek dimetylowy do dimetylowego sulfotlenku, jak również różne jednopierścieniowe związki aromatyczne. Do mikroorganizmów przeprowadzających te reakcje in vitro należą między innymi bakterie z rodzajów *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Rhodococcus*, *Xantobacter* i *Nitrosomonas*, a z grzybów przede wszystkim *Penicillium* i *Rhizoctonia*. Obecnie kometabolizm uważa się za jeden z najważniejszych mechanizmów przemian chlorowcowych pochodnych węglowodorów i aromatycznych [30], np. paration jest kometabolizowany przez *P. stutzeri* do



**Rysunek 3.** Schemat cyklu mineralizacji naftalenu dla *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4, *G*<sup>1</sup> zaproponowany przez Wacketta [9]; \* gentisat – 2,5-dihydroksybenzoesan

4-nitrofenolu i dietylofosforanu, a następnie fenol jest wykorzystywany, jako źródło węgla i energii przez *P. aeruginosa*.

### Węglowodory czteropierścieniowe: piren i chryzen

W glebach zanieczyszczonych związkami WWA w wykorzystywaniu pirenu znane są przede wszystkim bakterie z rodzaju *Mycobacterium*, które wykorzystują piren jako jedyne źródło węgla i energii. *Mycobacterium* sp. szczep PYR-1, wyizolowany z osadów ściekowych w pobliżu pól naftowych i oznaczony do gatunku przez Khan'a i in. [23] jako *M. vanbaalenii* PYR-1, jest zdolny do szybkiego utleniania fenantrenu, fluorantenu, pirenu i antracenu. Ostatnio doniesiono nawet o degradacji benzo[a]pirenu przez ten szczep bakterii [34].

Dużo jest prac dotyczących bakterii z rodzaju *Sphingomonas*, np. *Sphingomonas paucimobilis* szczep BP9, który mineralizuje piren (do  $28 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) w ciągu około 5 dni w zanieczyszczonych WWA glebach [21].

Jak donoszą Juhasz i in. [20] trzy szczepy *Burkholderia cepacia* wyizolowane z gleby rosły w pożywce z pirenem (w dawce  $0,1 \text{ mg} \cdot 100 \text{ cm}^{-3}$ ) i także wykorzystywały fluoranten i benzoantracen jako jedyne źródło węgla i energii. Ci sami autorzy wyizolowali z osadów morskich bakterie z rodzaju *Cycloclasticus*, które były zdolne do utleniania pirenu i fluorantenu (w dawce  $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) oraz fenantrenu o 10-krotnie wyższej ilości w pożywce.

Bakterie z rodzaju *Pseudomonas*, takie jak: *P. putida*, *P. aeruginosa* oraz szczepy bliżej niezidentyfikowane *Flavobacterium* sp., wyizolowane z gleb zanieczyszczonych WWA, są zdolne do metabolizowania fluorantenu i pirenu w pożywkach z dodatkiem węgla organicznego [44]. Inne gatunki z tego rodzaju, np. *P. fluorescens* wykorzystują również chryzen i benzoantracen [5, 34].

Mineralizacja pirenu przez *Bacillus cereus* szczep P21 i *P. stutzeri* szczep P16 była badana przez Kazunga i Aitkena [22] w pożywce płynnej zawierającej mieszaninę pirenu ( $5 \text{ mg} \cdot 500 \text{ cm}^{-3}$ ) i fenantrenu ( $50 \text{ mg} \cdot 500 \text{ cm}^{-3}$ ) z bursztynianem, peptonem i ekstraktem drożdżowym w okresie 2-tygodni. Po upływie tego czasu stwierdzono w supernatancie związek pośredni cis-4,5-dihydro-4,5-dihydroksypiren, który świadczył o mineralizacji pirenu przez klasyczny enzym dioksygenazę pirenową.

Kometaboliczna mineralizacja pirenu została stwierdzona przy biodegradacji fluorantenu przez bakterie *Alcaligenes denitrificans* i *P. paucimobilis* szczep EPA505, który również miał zdolności utleniania benzoantracenu, benzofluorenu i chryzenu [36].

Chryzen, węglowodór aromatyczny o czterech skondensowanych pierścieniach benzenowych jest najmniej rozpuszczalnym w wodzie ( $0,0015\text{--}0,0022 \text{ mg} \cdot 1000 \text{ cm}^{-3}$ ) wielopierścieniowym węglowodorem. Występuje on w niewielkich ilościach w smole węglowej, oleju antracenowym i krezotowym, które są powszechnie używane do impregnacji drewna, a zawartość w nich węglowodorów aromatycznych sięga 85%. Węglowodór ten jest również mniej czynny od izomerycznego naftacenu o budowie

chinoidowej i jest powszechnie uważany za trudno ulegający biodegradacji. Jakkolwiek można przeprowadzić jego mineralizację w mieszanych bakterialno-grzybowych kulturach. Gauthier i in. [12] w mieszankach drobnoustrojów z *Bacillus pumilus* szczep B44, *Microbacterium esteraromaticum* szczep B21, *Mycobacterium gilvum* szczep B1 i *Porphyrobacter* szczep B51 mineralizowali piren, benzo[a]piren i chryzen.

Inny gatunek bakterii *P. fluorescens* może również wykorzystywać benzoantracen i chryzen jako jedyne źródło węgla i energii [5]. Caldini i in. [5] stwierdzili po dwóch dniach inkubacji bakterii *P. fluorescens* w pożywce mineralnej z chryzenem w ilości  $1 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$  jako jedynym źródłem węgla, wzrost komórek do  $10^3$ . Niektóre szczepy tego gatunku były zdolne do mineralizacji benzoantracenu i benzonaftotiofenu. Ostatnio wyizolowano z zanieczyszczonych olejem z rafinerii gleb greckich, dwa nowe szczepy bakterii i oznaczono do rodzaju: *Microbacterium* i *Paracoccus*, które wykorzystywały wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, między innymi również i chryzen [50].

## Podsumowanie i wnioski

---

1. Samooczyszczanie gleb z węglowodorów aromatycznych jest procesem długotrwałym, dlatego stosuje się metody biologiczne, polegające na stworzeniu optymalnych warunków dla rozwoju mikroorganizmów glebowych zdolnych do rozkładu związków ropopochodnych. Prowadzi to do przyspieszenia procesów, które już zachodzą w środowisku.
2. Najczęściej degradacja związków ropopochodnych zachodzi sekwencyjnie z udziałem różnych grup mikroorganizmów współdziałających ze sobą. Syntetyzowane przez poszczególne szczepy enzymy, w reakcjach hydroksylacji, oksydacji, denitryfikacji, dezaminacji, hydrolizy bądź acylacji, mogą się wzajemnie uzupełniać w tworzeniu pełnych szlaków mineralizacji.
3. Bioremediacja wymaga zwiększenia liczebności i aktywności degradacyjnej endogennej mikroflory, a w razie potrzeby wprowadzenia w postaci szczepionki mikroorganizmów intensywnie degradujących zanieczyszczenie. Produkty ropopochodne w wyniku aktywności metabolicznej drobnoustrojów ulegają całkowitemu lub częściowemu przekształceniu w masę bakteryjną i stabilne, nietoksyczne produkty końcowe.
4. Wydaje się, że mineralizacja wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) przez mikroorganizmy glebowe jest najbardziej ekonomiczną i bezpieczną metodą usuwania tych zanieczyszczeń.



## Literatura

- 
- [1] Alexander M. 1999. Biodegradation and bioremediation, AP, San Diego, USA, ISBN: 0-12-049861-8: 252–258.
- [2] Barkay T., Navon-Venezia S., Ron E.Z., Rosenberg E. 1999. Enhancement of solubilization and biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by the bioemulsifier alasan. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2697–2702.
- [3] Barkovski A.L., Korshunova V.E., Pozdnyacova L.I. 1995. Catabolism of phenol and benzoate by *Azospirillum* strains. *App. Soil Eco.* 2: 17–24.
- [4] Bouchez M., Blanchet D., Vandecasteele J.P. 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43(1): 156–164.
- [5] Caldini G., Cenci G., Manenti R., Morozzi G. 1995. The ability of an environmental isolate of *Pseudomonas fluorescens* to utilise chrysene and other four-ring polynuclear aromatic hydrocarbon. *App. Microbiol. Biotechnol.* 44: 225–229.
- [6] Cerniglia C.E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation.* 3: 351–368.
- [7] Collieran E. 1996. Uses of bacteria in bioremediation. *Methods in Biotechnology 2: Bioremediation Protocols.*
- [8] Davies E.M., Murray H.E., Liehr J.G., Powers E.L. 1981. Basic microbial degradation rates and chemical byproducts of selected organic compounds. *Water Res.* 15: 1125–1127.
- [9] Ellis L.B.M., Hershberger D., Wackett L.P. 2000. Biocatalysis/Biodegradation Database: microorganisms, genomics and prediction. The University of Minnesota. *Nucleic Acids Research* 28(1): 377–379.
- [10] Field J.A., Stams A.J.M., Kato M., Schraa G. 1995. Enhanced biodegradation of aromatic pollutants in cocultures of anaerobic and aerobic bacterial consortia. *Antonie van Leeuwenhoek* 67: 47–77.
- [11] Fletcher J.S., McFarlane J.C., Pflieger T., Wickliff C. 1990. Influence of root exposure concentration on the fate of nitrobenzene in soybean. *Chemosphere* 20: 513–523.
- [12] Gauthier E., Dziel E., Villemur R., Juteau P., Lepine F., Beaudet R. 2003. Initial characterization of new bacteria degrading high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons isolated from a 2-year enrichment in a two-liquid-phase culture system. *J. Appl. Microbiol.* 94(2): 301–311.
- [13] Gescher J., Zaar A., Mohamed M., Schagger H., Fuchs G. 2002. Genes coding for a new pathway of aerobic benzoate metabolism in *Azoarcus evansii*. *J. Bacteriol.* 184(22): 6301–6315.
- [14] Haigler B.E., Pettigrew C.A., Spain J.C. 1992. Biodegradation of mixtures of substituted benzenes by *Pseudomonas* sp. strain JS150. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(7): 2237–2244.
- [15] He Z., Spain J.C. 1998. A novel 2-aminomuconate deaminase in the nitrobenzene degradation pathway of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45. *J. Bacteriol.* 180(9): 2502–2506.
- [16] Hervijnen R., Springael D., Slot P., Govers H.A.J., Parson J.R. 2003. Degradation of anthracene by *Mycobacterium* sp. strain LB501T proceeds via a novel pathway, through o-phthalic acid. *J. Appl. Microbiol.* 69(1): 186–190.

- [17] Hughes M.A., Williams P.A. 2001. Cloning and characterization of the pnb genes, encoding enzymes for 4-nitrobenzoate catabolism in *Pseudomonas putida* TW3. *J. Bacteriol.* 183(4): 1225–1232.
- [18] Hung-Kuang C., Zylstra G.J. 1998. Novel organization of the genes for phthalate degradation from *Burkholderia cepacia* DBO1. *J. Bacteriol.* 180(24): 6529–6537.
- [19] IARC. International Agency for Research on Cancer. 1987. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans. Overall evaluations of carcinogenicity. Lyon, France. Supplement 7: 440.
- [20] Juhasz A., Stanley G.A. 1997. Degradation of fluoranthene, pyrene, ben[a]anthracene and dibenz[a,h]anthracene by *Burkholderia cepacia*. *J. Appl. Microbiol.* 83: 189–198.
- [21] Kästner M., Breuer-Jammali M., Mahro B. 1994. Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41: 267–273.
- [22] Kazunga C., Aitken M.D. 2000. Products from the incomplete metabolism of pyrene by polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(5): 1917–1922.
- [23] Khan, A.A., Kim S.-J., Paine D.D., Cerniglia C.E. 2002. Classification of a polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing bacterium, *Mycobacterium* sp. strain PYR-1, as *Mycobacterium vanbaalenii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 1997–2002.
- [24] Kierner P., Tshisuaka B., Fetzner S., Lingens F. 1996. Degradation of benzoate via benzoyl-coenzyme A and gentisate by *Bacillus stearothermophilus* PK1, and purification of gentisate 1,2-dioxygenase. *Biol. Fert. Soils* 23(3): 307–313.
- [25] Kiyohara H., Sugiyama M., Mondello F.J., Gibson D.T., Yano K. 1983. Plasmid involvement in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a *Beijerinckia* species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 29, 111(3): 939–945.
- [26] Król M.J., Perzyński A. 2002. Wykorzystanie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) jako jedynego źródła węgla w wiązaniu wolnego azotu przez bakterie z rodzaju *Azospirillum*. *Pam. Pul.* 131: 69–80.
- [27] Kurek E., Król M.J., Zielewicz-Dukowska J., Perzyński A. 2001. Rozkład produktów nadtlenowych zanieczyszczających glebę przez bakterie wykorzystujące azot atmosferyczny. W: *Ekologia w przemyśle rafineryjnym*. ISBN 83-915734-0-0: 153–162.
- [28] Lee K., Gibson D.T. 1996. Toluene and ethylbenzene oxidation by purified naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(9): 3101–3106.
- [29] Lessner D.J., Johnson G.R., Parales R.E., Spain J.C., Gibson D.T. 2002. Molecular characterization and substrate of nitrobenzene dioxygenase from *Comamonas* sp. Strain JS765. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(2): 634–641.
- [30] Liu S., Suflita J.M. 1993. Ecology and evolution of microbial populations for bioremediation. *Trends Biotechnol.* 11: 344–352.
- [31] Marchenko A.I., Vorobyov A.V., Dyadishev N.R., Socolov M.S. 2001. Enhanced degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in plant rhizosphere. W: *Biogeochemical processes and cycling of elements in the environment*. (wyd.) Polish Society of Humic Substances. Wrocław: 465–467.
- [32] Menn F.M., Applegate B.M., Slayer G.S. 1993. NAH plasmid-mediated catabolism of anthracene and phenanthrene to naphtholic acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1938–1942.

- [33] Mohamed M.E., Zaar A., Ebenau-Jehle C., Fuchs G. 2001. Reinvestigation of a new type of aerobic benzoate metabolism in the proteobacterium *Azoarcus evansii*. *J. Bacteriol.* 183(6):1899–1908.
- [34] Moody J.D., Freeman J.P., Fu P.P., Cerniglia C.E. 2004. Degradation of benzo[a]pyrene by *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 340–345.
- [35] Morrison R.T., Boyd R.N. 1997. *Chemia organiczna*, Tom I, PWN Warszawa: 119–120.
- [36] Mueller J.G., Chapman P.J., Blattmann B.O., Pritchard P.H. 1990. Isolation and characterisation of a fluoranthene-utilising of *Pseudomonas paucimobilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1079–1086.
- [37] Nicholson C.A., Fathepure B.Z. 2004. Biodegradation of benzene by halophilic and halotolerant bacteria under aerobic condition. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(2): 1222–1225.
- [38] Nishino S.F., Spain J.C. 1993. Degradation of nitrobenzene by a *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2520–2525.
- [39] Park H.S., Kim H.S. 2000. Identification and characterization of the nitrobenzene catabolic plasmids pNB1 and pNB2 in *Pseudomonas putida* HS12. *J. Bacteriol.* 182(3): 537–580.
- [40] Reddy G.V.B., Gold M.H. 2000. Degradation of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: intermediates and reactions involved. *Microbiology* 146: 405–413.
- [41] Rius N., Fuste M.C., Guasp C., Lalucat J., Loren J.G. 2001. Clonal population structure of *Pseudomonas stutzeri*, a species with exceptional genetic diversity. *J. Bacteriol.* 183: 736–744.
- [42] Sanseverino J., Applegate B.M., King J.M.H., Saylor G.S. 1993. Plasmid-mediated mineralization of naphthalene, phenanthrene, and anthracene. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1931–1937.
- [43] Smith R. V., Rosazza J. P. 1974. Microbial models of mammalian metabolism. Aromatic hydroxylation. *Arch. Biochem. Biophys.* 161: 551–558.
- [44] Śliwka E., Kałuzińska I., Kołwzan B., Surygała J. 1997. Badania podatności olejów napędowych na biodegradację. W: Technologie odolejania gruntów, odpadów, ścieków. I Konferencja Naukowo-Techniczna. Polskie Towarzystwo Inżynierii Ekologicznej Bio-Ecology Services sp. z.o.o. Joint Venrure Rafineria Nafty „Glimar” S.A. w Gorlicach, Gorlice–Wysowa Zdrój 1997, Wydawnictwo Ekoinżynieria, ISBN 83-9054-9-7: 97–102.
- [45] Trzesicka-Młynarz D., Ward O.P. 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a mixed and its component pure cultures, obtained from PAH-contaminated soils. *Can. J. Microbiol.* 41(6): 470–476.
- [46] Volkering F., Breure A., van Andel J.G. 1993. Effect of microorganisms on the bioavailability and biodegradation of crystalline naphthalene *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40: 535–540.
- [47] Yang Y., Chen R.F., Shiaris M.P. 1994. Metabolism of naphthalene, fluorene, and phenanthrene: preliminary characterisation of cloned gene cluster from *Pseudomonas putida* NCIB 9816. *J. Bacteriol.* 176: 2158–2164.
- [48] Zielewicz-Dukowska J., Kurek E., Król M.J., Perzyński A. 2001. *Pseudomonas stutzeri* – bakterie wiążące azot z wykorzystaniem antracenu, jako jedyne źródła węgla. Biopreparaty w ochronie i użytkowaniu środowiska. *Inżynieria Ekologiczna* 4: 76–82.
- [49] Zhang H., Hanada S., Shigematsu T., Shibuya K., Kamagata Y., Kanagawa T., Kurane R. 2000. *Burkholderia kururiensis* sp. nov., a trichloroethylene (TCE)-degrading bacterium isolated from an aquifer polluted with TCE. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 743–749.

- [50] Zhang H., Kallimanis A., Koukkou A.I., Drainas C. 2004. Isolation and characterization of novel bacteria degrading polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted Greek soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(1): 124–131.

## Some aspects concerning biodegradation of monocyclic and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)

---

**Key words:** aromatic hydrocarbons, microorganisms, mineralization

### Summary

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are the compounds whose presence in contaminated soils and sediments poses a significant risk to the environment, they show also cytotoxic, mutagenic, and in some cases carcinogenic effects on human tissue. A wide range of different microorganisms in the soils are able to metabolize, cometabolize and utilize the PAHs as a sole source of carbon and energy. The aerobic catabolism of monocyclic and two-, threecyclic aromatic hydrocarbons by bacteria has been extensively studied. Naphthalene was often selected as a model compound for the study of PAH degradation because of its high aqueous solubility and the easy isolation of microbes capable of its degradation. Since the first report of a biochemical pathway for naphthalene oxidation by *Pseudomonas* species in 1964 by Davis and Evans, extensive studies have rigorously defined the metabolic pathway genes, and enzymes involved. In last decade a number of bacteria that metabolise larger PAHs molecules have been isolated. These include *Azoarcus evansii*, various *Mycobacterium* species and several *Pseudomonas* species. A number of different metabolic pathways have been established for the bacterial degradation of PAHs. The genes coding for the enzymes involved in the degradation of alkanes (*alk*), naphthalene (*nah*), benzoate *via ortho* clavage of catechol (in bacteria) or prothocatechuate (in fungi) by the  $\beta$ -keto adipate pathway have been extensively characterized. The various microorganisms species mineralizing four-ring PAHs including phenanthrene, pyrene and chrysene have been also isolated.