



Szlaki tlenowej biodegradacji węglowodorów ropy naftowej

Ewa Kwapisz

Instytut Biochemii Technicznej, Politechnika Łódzka, Łódź

Pathways of aerobic petroleum oil hydrocarbons biodegradation

Summary

The paper reviews the aspects of physiology and biochemistry of microbial biodegradation of the main components of petroleum oil: alkanes (larger than methane), alkenes, alkynes, cyclic, polycyclic, aromatic and polyaromatic hydrocarbons. It focuses on aerobic degradation pathways. The review provides key information prepared on the basis of more than 30 years of research on microbial degradation of hydrocarbons. The areas discussed include new pathways of biodegradation of branched-chain alkanes, cyclic and polyaromatic hydrocarbons which have been discovered during the past few years. Special attention was paid to oxygenases – enzymes initiating aerobic metabolism of hydrocarbons and phenomenon of co-oxidation which enables assimilation of most recalcitrant components of crude oil.

Key words:

hydrocarbons, petroleum oil, biodegradation pathways, metabolism, co-oxidation.

1. Wstęp

U podstaw rozwoju gospodarki człowieka leży wykorzystanie zasobów naturalnych, wśród których najważniejszymi są ropa naftowa i gaz ziemny. Nadmierna eksploatacja złóż naftowych, awarie podczas wydobywania, magazynowania, transportu i przerobu surowców, to główne przyczyny narastającego skażenia przyrody węglowodorami z ropy naftowej. Większość z jej składników to związki mniej lub bardziej toksyczne dla organizmów żywych. Substancje te, kumulowane w roślinach mogą

Adres do korespondencji

Ewa Kwapisz,
Instytut Biochemii
Technicznej,
Politechnika Łódzka,
ul. Stefanowskiego 4/10,
90-924 Łódź.

biotechnologia

2 (73) 166–188 2006

przedostać się do organizmów wszystkich ogniw łańcucha pokarmowego. Szkodliwe działanie zanieczyszczeń ropą naftową wynika również z jej oleistej konsystencji. Warstwa węglowodorów na powierzchni gruntu lub wody utrudnia dostęp tlenu do warstw niżej położonych. Jedną z głównych strategii likwidacji skażeń ropą naftową i jej produktami jest bioremediacja, polegająca na wykorzystaniu zdolności niektórych mikroorganizmów do rozkładu węglowodorów i ich utlenieniu do dwutlenku węgla i wody. Na użytek technologii bioremediacji przygotowuje się wyspecjalizowane zestawy (konsorcja) drobnoustrojów, wykazujących szczególne uzdolnienia do degradacji poszczególnych grup węglowodorów. Konsorcja te powinny szybko adaptować się w skażonym środowisku, a rozkład zanieczyszczeń powinien prowadzić do detoksykacji środowiska, obrazowanej szybkim spadkiem stężeń składników ropopochodnych, bez gromadzenia szkodliwych metabolitów. Przygotowanie tego typu biopreparatów wymaga znajomości fizjologii drobnoustrojów, szlaków biodegradacji, zasad funkcjonowania systemów enzymatycznych z pogranicza metabolizmu peryferyjnego i centralnego, dzięki którym może dojść do utlenienia ksenobiotyków.

Praca ta stanowi przegląd najważniejszych dróg metabolicznych funkcjonujących u bakterii i grzybów, według których mogą podlegać rozkładowi węglowodory ropy naftowej. Ze względu na obszerność zagadnienia, w opracowaniu tym omówione zostaną tylko szlaki przemian zachodzących w warunkach tlenowych.

2. Charakterystyka ropy naftowej

Ropa naftowa stanowi wysoce złożoną mieszaninę wielu tysięcy węglowodorów, które można sklasyfikować w trzech grupach: węglowodory alifatyczne, aromatyczne i związki polarne. Wśród węglowodorów alifatycznych wyróżnia się węglowodory prostołańcuchowe, rozgałęzione oraz związki cykliczne. Węglowodory aromatyczne występują w formie związków jednopierścieniowych (np. benzen, toluen) oraz związków poliaromatycznych, np. naftalen, fenantren czy piren. Frakcja polarna, to związki zawierające heteroatomy takie jak np. azot, siarka czy tlen. Podczas biodegradacji węglowodorów ropy naftowej, lub jej wybranych frakcji, metabolizowanych jest tysiące różnorodnych związków. Z chemicznego punktu widzenia reakcje zachodzące podczas ich asymilacji przez drobnoustroje to głównie: acylowanie, alkilowanie, dealkilowanie, dehalogenacja, hydroliza estrów lub amidów, utlenianie, redukcja, hydroksylacja pierścienia aromatycznego, rozerwanie pierścienia, kondensacja i tworzenie koniugatów. Działanie drobnoustrojów ujawnia się przede wszystkim: utlenieniem cząsteczki węglowodoru, rozerwaniem wiązań C-C, atakiem na grupy funkcyjne zawierające np. metal lub siarkę oraz biokrakingiem węglowodorów cięższych (1).

3. Drobnoustroje degradujące węglowodory

Węglowodory ropy naftowej to substancje stabilne chemicznie, które mogą jednak podlegać rozkładowi z udziałem drobnoustrojów. Bakterie wykazujące zdolność do degradacji węglowodorów występują licznie zarówno w wodach słodkich, morskich jak i gruntach. Drożdże zasiedlają chętniej ekosystemy wodne, grzyby stanowią grupę dominującą w gruntach (2,3). Do grupy mikroorganizmów wykazujących zdolność do degradacji składników ropy naftowej lub wybranych jej frakcji należą m.in. BAKTERIE: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, DROŹDŹE: *Candida*, *Debaromyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Sporobolomyces*, *Torulopsis*, *Trichosporon*, GRZYBY: *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mortierella*, *Mucor*, *Penicillium*, *Sporotrichum*, *Varicospora*. Żaden z drobnoustrojów nie jest zdolny do biodegradacji węglowodorów wszystkich grup, mogą jedynie przyswajać wybrane rodzaje związków, o określonych strukturach chemicznych (4). Wśród bakterii o stosunkowo szerokim spektrum substratowym wymienić należy szczepy *Pseudomonas*. Wzrasta również zainteresowanie szeroko rozpowszechnionymi w przyrodzie promieniowcami, tlenowymi bakteriami gramdodatnimi, reprezentowanymi m.in. przez rodzaje *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Gordonia*, *Mycobacterium* lub *Dietzia*. Mikroorganizmy te posiadają uzdolnienia enzymatyczne do transformacji i degradacji różnych grup węglowodorów, zarówno alifatycznych jak i aromatycznych oraz trudno przyswajalnych związków alicyklicznych (5-8). Bakterie te wykazują zdolność do asymilacji do-decylocykloheksanu (9), 2,6,10,14-tetrametylopentadekanu (8), fenylodekana (10). Szczególną grupę drobnoustrojów stanowią grzyby, np. *Phanaerochaete chrysosporium* wytwarzające pozakomórkowe ligninolityczne peroksydazy atakujące pierścienie węglowodorów zarówno mono- (11) jak i poliaromatycznych (12). Przemianom prowadzonym przez grzyby mikroskopowe może towarzyszyć pojawianie się produktów pośrednich, niekiedy bardziej toksycznych od wyjściowego substratu.

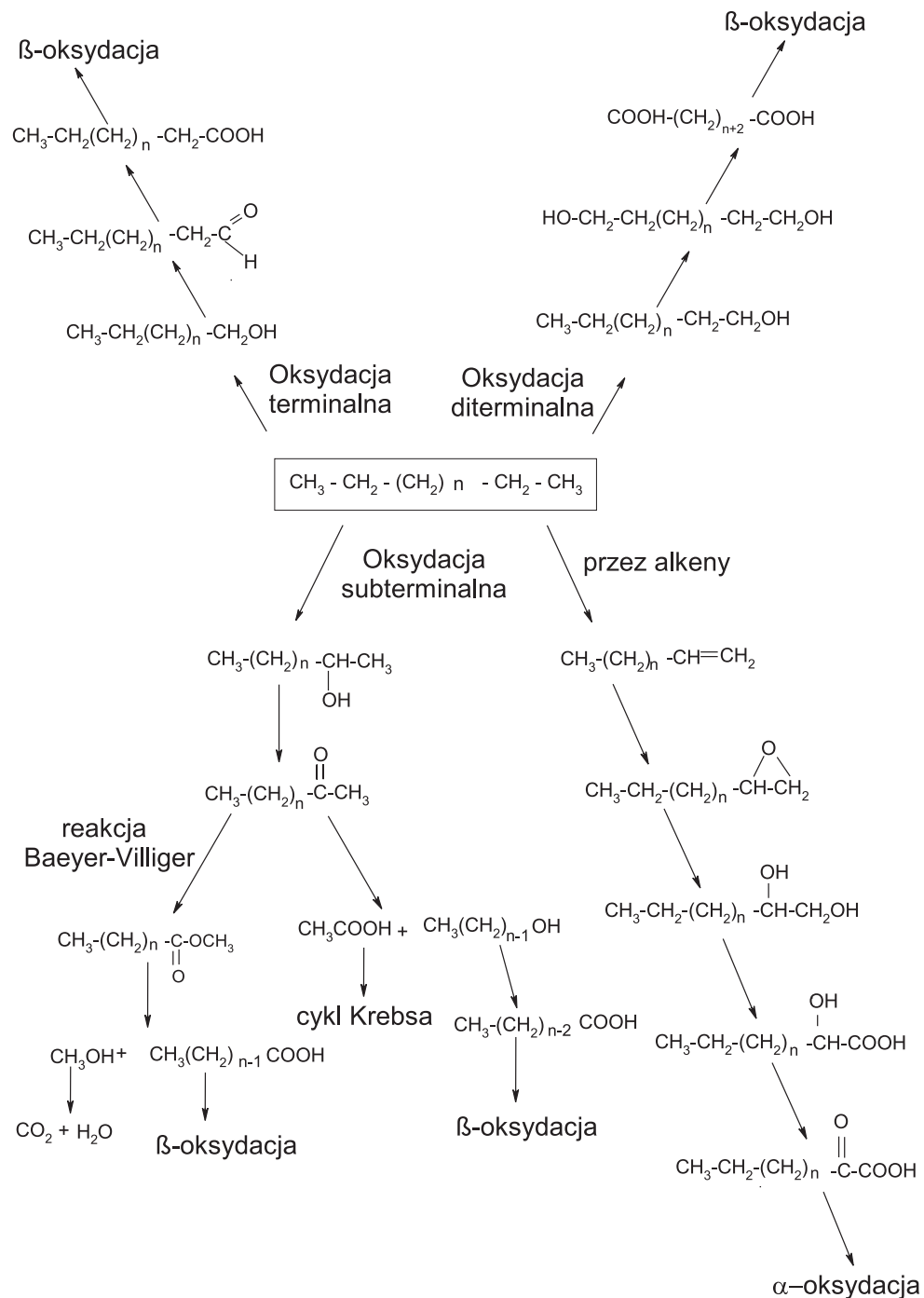
W proces biodegradacji węglowodorów w środowisku wodnym czy gruntowym włącza się wiele grup mikroorganizmów, od wybitnie tlenowych do bezwzględnych beztlenowców. Biodegradacja większości substancji ropopochodnych przebiega szybciej w warunkach tlenowych i jest bardziej kompletna. W warunkach beztlenowych biodegradacji ulegają alkany C₁₂-C₂₀ (13), węglowodory monoaromatyczne (14) i poliaromatyczne (15). W literaturze podkreśla się fakt, że badania metabolizmu drobnoustrojów w podłożach zawierających pojedynczy węglowodór nie oddają tego co dzieje się w obecności mieszanin tych związków i podobnie, użycie monokultur nie ilustruje tego co dzieje się w obecności populacji mieszanych, stanowiących naturalną mikroflorę danego środowiska, często degradujących mieszaninę węglowodorów efektywniej niż pojedyncze kultury. Powszechnie uznaje się, że dla osiągnięcia całkowitej degradacji mieszaniny związków ropopochodnych wymagany jest udział wielu współdziałających ze sobą mikroorganizmów.

Postęp procesu biodegradacji węglowodorów ropy naftowej prowadzonej w miejscu skażenia zależy w dużym stopniu od specyfiki środowiska i bytującej tam mikroflory. W pierwszej kolejności wykorzystywane są n-alkany, powodując obfity wzrost drobnoustrojów. Wówczas gdy w środowisku pozostają substancje bardziej odporne na biodegradację, organizmy te muszą ustąpić drobnoustrojom, często o niższej szybkości wzrostu, ale o wyjątkowych uzdolnieniach metabolicznych (16). Z badań Cerniglia (17) wynika, że węglowodory ropy naftowej pod względem podatności na biodegradację można uszeregować w następującym porządku (od najłatwiej do najtrudniej degradowalnych): liniowe alkanany C_{10} - C_{25} , węglowodory gazowe C_2 - C_4 , alkanany C_5 - C_9 , alkanany rozgałęzione do C_{12} , alkeny C_2 - C_{11} , rozgałęzione alkeny, węglowodory mono- i poliaromatyczne, cykloalkany. Ilość wyizolowanych drobnoustrojów, wykazujących zdolność do wzrostu w obecności wymienionych grup substratów maleje w tym samym porządku. Szczególną frakcją ropy naftowej stanowią asfalteny. Asfalteny to nierozpuszczalne węglowodory zawierające struktury aromatyczne i alicykliczne z krótkimi, alkilowymi odgałęzieniami. Związki te są odporne na biodegradację. Degradacja asfaltenów może zachodzić jedynie w mieszaninie z frakcją olejową. O pełnej degradacji substancji ropopochodnych decyduje m.in. zdolność drobnoustrojów do rozkładu związków pośrednich, takich jak kwasy karboksylowe alifatyczne i kwasy tłuszczowe (18). Kwasy tłuszczowe z pojedynczym rozgałęzieniem, zamiast ulegać dalszym przemianom w ramach β -oksydacji, mogą być włączane do membran lipidów (19). Wolne kwasy tłuszczowe, wydzielane poza komórkę mogą pełnić rolę biosurfaktantów, co stwierdzono dla szczepu *Acinetobacter* hodowanego w podłożu z n-heksadekanem (3). Drobnoustroje, poza biodegradacją, mogą powodować również zwiększenie cząsteczki węglowodoru, np. syntetyzować woski czy materiały smołowe.

Różnorodność dróg metabolicznych funkcjonujących u różnego typu drobnoustrojów w odniesieniu do poszczególnych grup węglowodorów uniemożliwia summaryczne przedstawienie zagadnienia i wymaga oddzielnego omówienia szlaków biodegradacji dla alkanów, izoalkanów, alkenów, związków cyklicznych, mono- i poliaromatycznych.

4. Degradacja alkanów

n-Alkany, to grupa węglowodorów degradowana stosunkowo łatwo przez wiele rodzajów mikroorganizmów: *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Acinetobacter*, *Sphingomonas*, *Xanthobacter*. Szczególny przypadek stanowi pierwszy w szeregu homologicznym węglowodór – metan, ulegający utlenieniu do dwutlenku węgla z udziałem bakterii metylotroficznych. Proces obejmuje kilka reakcji. Pierwsza z nich prowadzona jest z udziałem monooksygenazy metanowej (EC 1.14.13.25). Powstały metanol jest następnie utleniany do formaldehydu, kwasu mrówkowego i dwutlenku węgla. Etan, propan, butan mogą być utleniane przez szczepy *Pseudomonas*

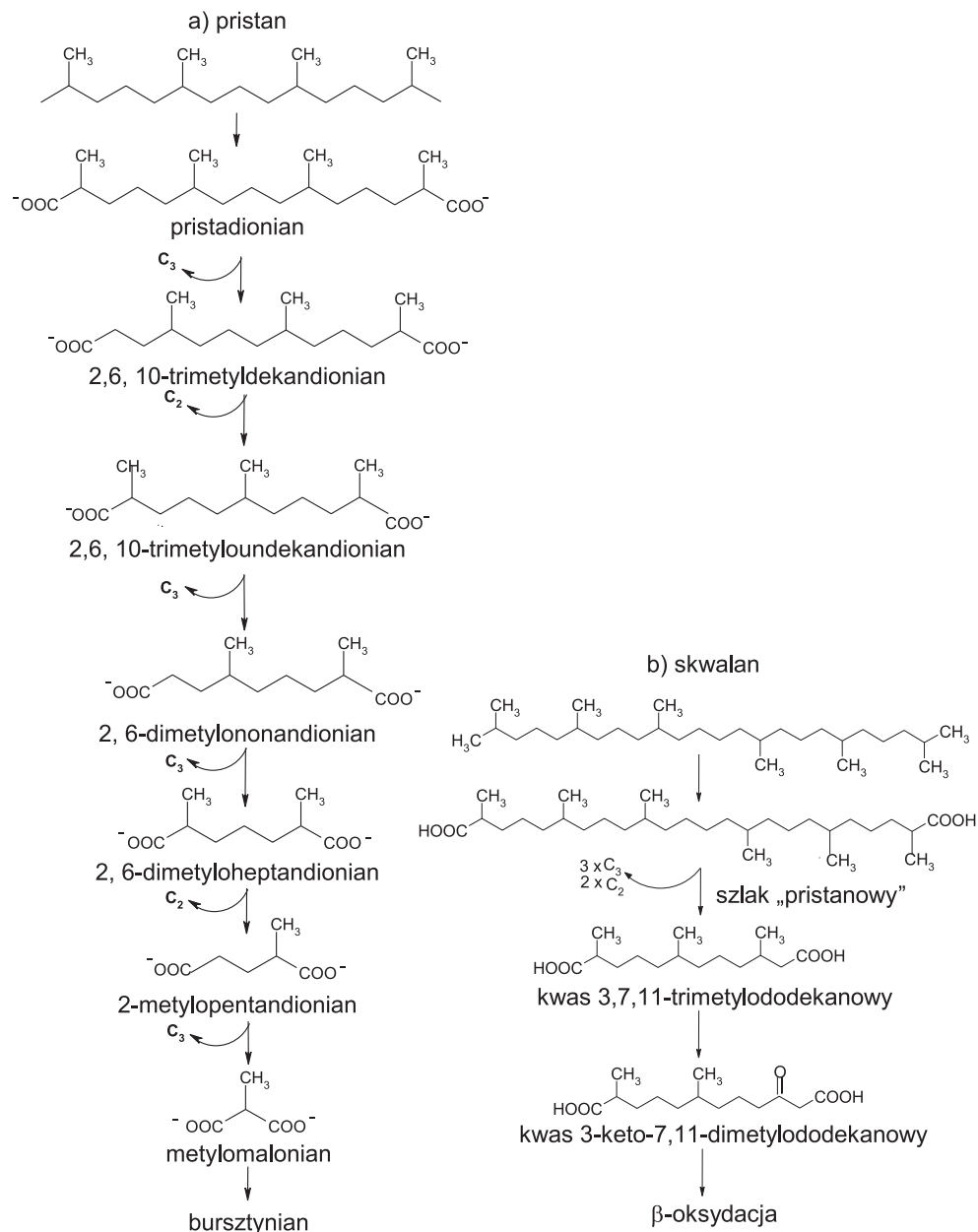


Rys. 1. Drogi biodegradacji alkanów.

methanica, kometabolicznie w obecności metanu. n-Alkany mogą być degradowane drogą terminalną, diterminalną, subterminalną lub przez alkeny. Przemiany zachodzące w ramach tych szlaków przedstawiono na rysunku 1. Pierwszy etap asymilacji n-alkanów w warunkach tlenowych polega na wbudowaniu atomu tlenu przy udziale monooksygenaz. W przypadku drogi terminalnej insercja aktywnego tlenu zachodzi w wolnym końcu alkilowego łańcucha węglowodoru z utworzeniem alkoholu, aldehydu i następnie – kwasu tłuszczowego (18). Kwasy tłuszczowe są degradowane na drodze β -oksydacji, której produktami są kwasy krótsze o dwa atomy węgla i acetyloCoA (dla węglowodorów o parzystej liczbie atomów węgla) lub propionylo-CoA (dla węglowodorów o nieparzystej liczbie atomów węgla). Te ostatnie, dzięki wykorzystaniu energii ATP mogą wrócić w formie CoA do następnego obiegu cyklu. W procesie diterminalnej oksydacji po przyłączeniu atomu tlenu do jednej z końcowych grup alkanu włącza się monooksygenaza kwasów tłuszczowych (EC 1.14.14.1), co prowadzi do powstania kwasu dikarboksylowego. W przypadku oksydacji subterminalnej utlenieniu ulega wewnętrzna grupa metylowa, w wyniku czego powstaje alkohol drugorzędowy, a następnie keton. Baeyer-Villiger monooksygenaza (EC 1.14.13.-) przekształca ketony do estrów, które ulegają rozszczepieniu pod wpływem esteraz. Oksydacji subterminalnej ulegają głównie alkany długołańcuchowe (19). Proces rozkładu n-alkanów na drogach: mono-, di- i subterminalnej, dla węglowodorów zawierających do ośmiu atomów węgla, inicjowany jest często przez monooksygenazę metanową (EC 1.14.13.25), dla węglowodorów zawierających więcej niż osiem atomów węgla – przez 1-monooksygenazę alkanową (EC 1.14.15.3). W przypadku drogi degradacji przez alkeny reakcje rozkładu inicjuje reduktaza 2-heksadekanolowa (EC 1.3.1.27), sprzężona z NAD, po czym, pod wpływem odpowiednich monooksygenaz tworzone są epoksydy i diole. Powstałe w kolejnych reakcjach kwasy tłuszczowe podlegają α -oksydacji.

5. Biodegradacja alkanów rozgałęzionych

Alkany rozgałęzione (izoalkany) stanowią trudniejszy substrat dla drobnoustrojów od n-alkanów. Niewielka liczba podstawników metylowych lub etylowych nie obniża w sposób istotny degradowalności tych związków, chyba że, poprzez swoje usytuowanie, uniemożliwią włączenie powstałych kwasów tłuszczowych w szlak β -oksydacji (lub α -oksydacji). Dłuższe i bardziej liczne rozgałęzienia zlokalizowane blisko centrum podstawowego łańcucha czynią izoalkany trudniej degradowanymi (20). Stosunkowo niewielka liczba drobnoustrojów wykazuje zdolność do degradacji tych związków. Z badań prowadzonych przez Fall i wsp. (21) dla szczepu *Pseudomonas citronellolis* wynika, że rozgałęzione węglowodory, np. 2,6-dimetylo-2-okten, mogą być metabolizowane wg szlaku cytronelowego, w którym główny metabolit – cytronelol po przekształceniu do geranylo-CoA ulega β -oksydacji. Klasycznym przykładem rozgałęzionego alkanu, odpornego na degradację jest pristan (2,6,10,14-tetrametylo-



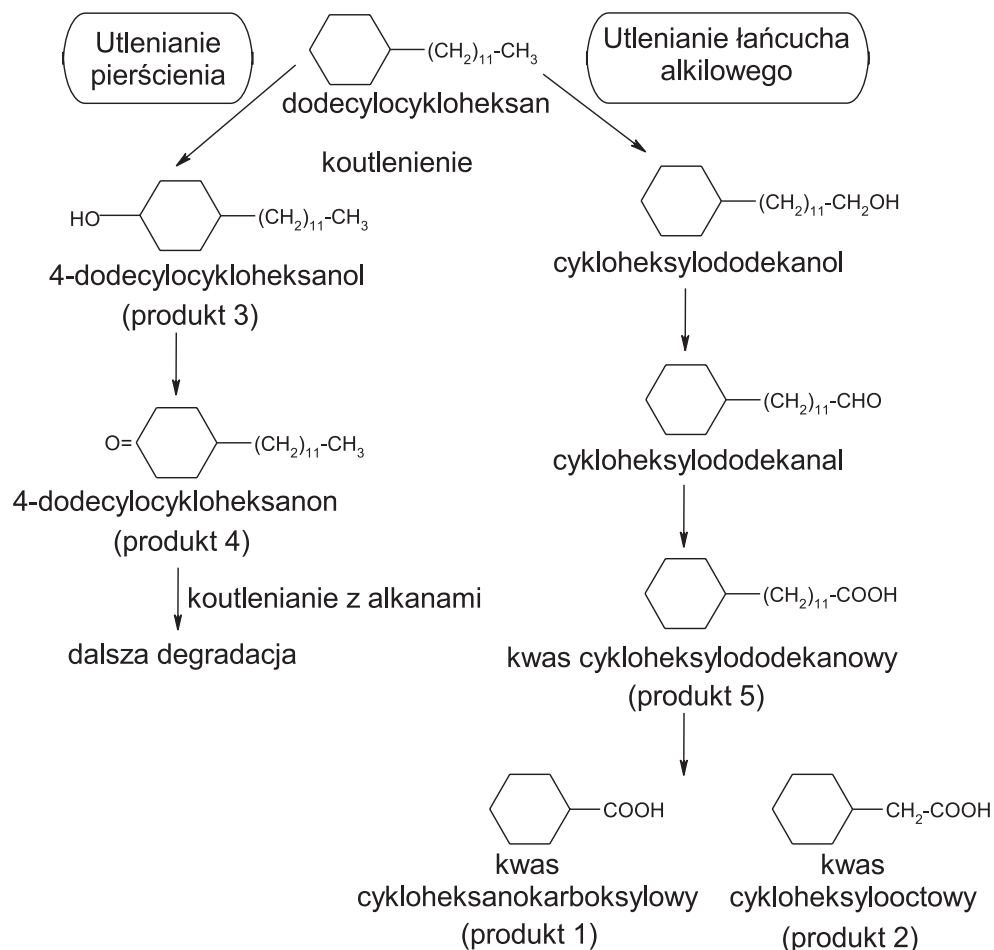
Rys. 2. Drogi biodegradacji izoalkanów na przykładzie a) pristanu (22) i b) skwalanu (26).

pentadekan). Związek ten używany jest jako marker w analizie skażeń substancjami ropopochodnymi. Nieliczne gatunki grzybów i bakterii (*Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Nocardia*) wykazują zdolność do degradacji tego związku (22). Z badań nad biodegra-

dacją pristanu (23) i innych węglowodorów rozgałęzionych np. fytanu, norpristanu, (24,25) wynika, że najczęściej atakowane są terminalne grupy izopropylowe i produktami wstępnego utlenienia są terminalne alkohole (rys. 2a). Interesujące informacje na temat biodegradacji skwalanu (2,6,10,15,19,23-heksametylotetrakozanu), zawarte są w pracy Berekaa i Steinbuchel (26). Jest to pierwsze doniesienie na temat biodegradacji tego związku. Wyizolowane przez nich szczepy *Mycobacterium fortuitum* NF4 i *Mycobacterium ratisbonense* SD4 degradują skwalan tworząc kwas dikarboksylowy, z którego po oddzieleniu trzech cząsteczek propionyl-CoA i dwóch cząsteczek acetyl-CoA powstaje kwas 3,7,11-trimetylododekandioowy, pośrednik typowy dla biodegradacji pristanu. Po czym, grupy β -metylowe tego intermediatu zostają zastąpione grupami karbonyłowymi, typowymi dla szlaku cytronelowego. Szlak biodegradacji skwalanu przedstawiono na rysunku 2b.

6. Biodegradacja cykloalkanów

Cykliczne alkany, to jedne z głównych składników ropy naftowej, należą do związków wysoce odpornych na biodegradację, niektóre z nich są również bardzo toksyczne (18). Niska podatność na degradację jest prawdopodobnie spowodowana brakiem terminalnych grup metylowych, sprzyjających zainicjowaniu utlenienia. Kompleksowe związki alicykliczne np. hopany należą do skażeń najdłużej zalegających w środowisku. Uważa się, że biodegradacji mogą podlegać jedynie struktury zawierające do sześciu alicyklicznych pierścieni. Cykloalkany, (szczególnie te zawierające 4-6 pierścieni) przyswajane są głównie dzięki zjawisku kometabolizmu (w obecności kosubstratów) i (lub) komensalizmu czy mutualizmu (form współbywania drobnoustrojów). Zjawiska te są, jak się wydaje, bardzo istotne, bowiem jak dotąd, odkryto tylko nieliczne drobnoustroje zdolne do wykorzystywania tych związków jako jedyne źródła węgla i energii (27-29). Z pracy Beam i Perry (9) wynika, że cykloalkany w wyniku koutlenienia mogą być przekształcone przy udziale peroksydazy czy polifenolooksydazy do cykloalkanonów. Powstałe cykloalkanony mogą być dalej metabolizowane na zasadach komensalizmu (30). Dwa współpracujące ze sobą szczepy bakterii wykorzystujące cykloheksan jako jedyne źródło węgla zostały wyizolowane przez Hornick i wsp. (31). Degradacja przebiega w dwóch etapach. W pierwszym z nich, jeden ze szczepów utlenia substrat w obecności alkanów (kometabolizm) do cykloheksanolu lub cykloheksanonu, następnie inicjatywę przejmuje drugi szczep, degradując powstałe intermediaty. Związki alicykliczne, zawierające podstawniki (np. metylocykloheksan i metylocyklopentan) łatwiej ulegają degradacji, jednakże podstawowym mechanizmem odpowiedzialnym za ich rozkład pozostaje kometabolizm. Najczęściej, jako pierwsze atakowane są podstawniki alkiłowe, po czym następuje rozszczepienie pierścienia. Tezę tę potwierdzają badania Beam i Perry (9) nad biodegradacją dodecylocykloheksanu przez szczepy *Mycobacterium*. Identyfikacja takich związków pośrednich jak kwas cykloheksylododekanowy i cy-



Rys. 3. Biodegradacja dodecylcykloheksanu (28,29).

kloheksylooctowy wskazuje, że jako pierwsze atakowane są podstawniki. Z badań Koma i wsp. (28) wynika, że szczep *Acinetobacter* sp. ODDK71 degraduje dodecylcykloheksan kometabolicznie, w obecności heksadekanu. Na podstawie identyfikacji metabolitów pośrednich ustalono, że degradacja ta przebiega według dwóch szlaków. W pierwszym z nich, substrat zostaje utleniony kolejno do cykloheksylododekanolu, cykloheksylododekanalu i kwasu cykloheksylododekanowego. Ten ostatni zostaje przekształcony do kwasu cykloheksanokarboksylowego według nie znanego dotąd mechanizmu. Pojawianie się tego intermediatu obserwowano wcześniej dla szczepu *Alcanivorax* (32). Produkty tego szlaku, odkryte przez Koma i wsp. (28): kwas cykloheksylooctowy i kwas cykloheksanokarboksylowy nie podlegają dalszej degradacji. Drugi szlak degradacji dodecylcykloheksanu polega na utworzeniu 4-do-

decylocykloheksanolu i utlenieniu go do 4-dodecylocykloheksanonu. Metabolit ten może podlegać dalszej degradacji tylko w obecności heksadekanu. Ci sami badacze (29), opisują degradację dodecylocykloheksanu z udziałem szczepu *Rhodococcus* sp. NDKK48, atakującego substrat zarówno od strony pierścienia jak i podstawnika alkielowego. Poznane dotychczas drogi biodegradacji dodecylocykloheksanu przedstawiono na rysunku 3.

7. Degradacja alkenów

Alkeny są rzadko spotykanymi składnikami ropy naftowej. 1-Alkeny są utleniane głównie od nasyconego końca łańcucha zgodnie z mechanizmem degradacji alkanów (31). Metabolizm alkenów może rozpocząć również atak na podwójne wiązanie z utworzeniem alkano-1,2-diolu lub epoksydów (rys. 1), które następnie są przekształcane do kwasów tłuszczowych. Wiele drobnoustrojów nie wykazuje zdolności do wzrostu w obecności alkenów o długości łańcucha mniejszej niż C₁₂. Prawidłowością jest również, że 2-alkeny podlegają łatwiej degradacji niż 1-alkeny, bowiem obecność terminalnych grup metylowych czyni je bardziej podatnymi na biodegradację. Asymilacja diterminalnych alkenów zachodzi niewiele trudniej od pojedynczo nienasyconych, produktami przejściowymi są epoksydy lub diole (33). Utylizacja alkenów zawierających podwójne wiązania w środku łańcucha prowadzi często do utworzenia nienasyconych kwasów tłuszczowych.

8. Degradacja węglowodorów aromatycznych

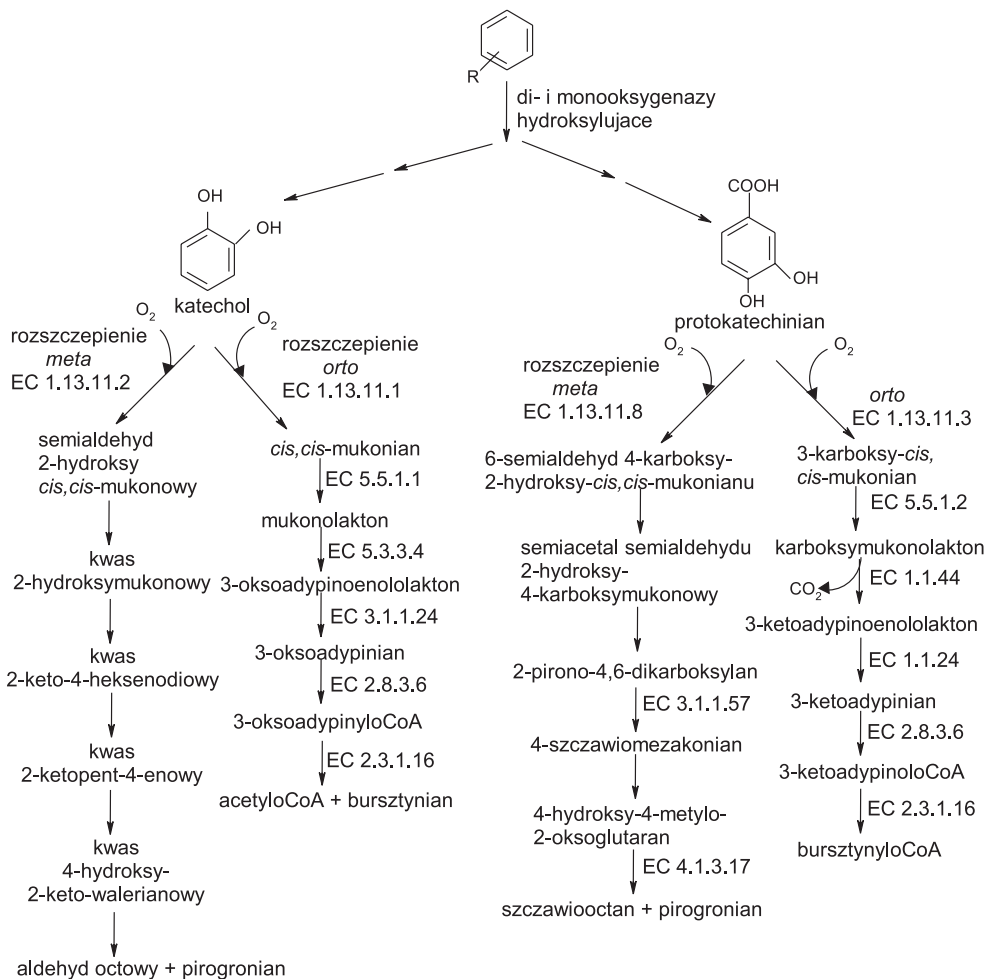
Wiele drobnoustrojów wyposażonych jest w systemy enzymatyczne odpowiedzialne za katabolizm naturalnie występujących związków aromatycznych. Proces biodegradacji węglowodorów aromatycznych z udziałem bakterii obejmuje pięć faz:

1. Wchłonięcie cząsteczki węglowodoru do komórki. Proces ten może odbywać się na zasadach prostej dyfuzji lub na bazie specyficznego mechanizmu transportu.
2. Przygotowanie substratu do rozerwania pierścienia.
3. Rozerwanie pierścienia.
4. Przekształcenie związku powstałego po rozszczepieniu pierścienia do intermediatów amfibolicznych.
5. Włączenie intermediatów amfibolicznych do przemian centralnych.

Asymilacja związków aromatycznych z udziałem drobnoustrojów może przebiegać zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych. Proces beztlenowy przebiega wolniej i drogi biodegradacji bez dostępu tlenu nie są dokładnie poznane. Szlaki tlenowej biodegradacji węglowodorów jednopierścieniowych oraz naftalenu i fenantrenu są intensywnie badane od lat siedemdziesiątych (34-42). Z badań tych wynika, że główną rolę w utlenianiu węglowodorów aromatycznych odgrywają

oksygenazy (di- i monooksygenazy) uczestniczące w reakcjach hydroksylacji i rozerwania pierścienia. Podstawowymi produktami hydroksylacji pierścienia i dalszego utlenienia z udziałem dehydrogenaz są katechol i kwas protokatechowy (43). Większość pojedynczo lub podwójnie podstawionych pierścieni aromatycznych, jak np. w kwasie migdałowym, fenyloalaninie, toluenie, benzoianie, salicylanie i fenolu przekształcanych jest do katecholu. Pierścienie podstawione podwójnie, w pozycjach 1,3 i 1,4 oraz pierścienie wielokrotnie podstawione przekształcane są częściej do kwasu prokatechowego. Powstały katechol i (lub) kwas prokatechowy stanowią punkt wyjścia dla enzymatycznego rozerwania pierścienia. Reakcja rozszczepienia pierścienia aromatycznego może przebiegać w dwojaki sposób. W przypadku katecholu, jeśli rozszczepienie ma miejsce między dwoma sąsiadującymi grupami hydroksylowymi, to jest to rozszczepienie typu *orto* (intradiolowe), jeżeli reakcja polega na rozbiciu wiązania między hydroksylovanym i sąsiadującym – niehydroksylovanym atomem węgla to jest to rozszczepienie typu *meta* (eksradiolowe). Pierwsze z nich, odbywające się przy udziale 1,2-dioksygenazy katecholowej (EC1.13.11.1) wiedzie do utworzenia kwasu *cis,cis*-mukonowego, drugie, prowadzone przez 2,3-dioksygenazę katecholową (EC1.13.11.2) powoduje powstanie semialdehydu 2-hydroksymukonowego. Produktami dalszych przemian typu *orto* są: kwas bursztynowy, acetylo-CoA, typu *meta*-aldehid octowy i pirogronian. Do biodegradacji węglowodorów aromatycznych szczególnie predystynowane są szczepy *Pseudomonas* kodujące chromosomalnie enzymy szlaku *orto* (44) i plazmidowo – szlak rozszczepienia typu *meta*-, specyficzny dla takich związków jak fenol, krezol, toluen. Protokatechinian może być również rozszczepiany według dwóch różnych dróg: *orto*- i *meta*-. W szlaku *orto*-, za rozerwanie pierścienia odpowiedzialna jest 3,4-dioksygenaza prokatechinianowa (EC1.13.11.3), w szlaku *meta*- reakcja ta prowadzona jest przez 4,5-dioksygenazę protokatechinianową (EC1.13.11.8). Reakcje rozszczepienia katecholu i kwasu protokatechowego według szlaków *orto* i *meta* przedstawiono na rysunku 4.

Podatność na biodegradację poszczególnych węglowodorów aromatycznych zależy w dużym stopniu od obecności podstawników. Degradacja związków aromatycznych z podstawnikami polega głównie na utlenieniu bocznego łańcucha, a następnie na rozszczepieniu pierścienia (20). Prosty podstawnik alkilowy powoduje zazwyczaj, że związek staje się łatwiej degradowalny, duża liczba podstawników alkilowych może jednak hamować biodegradację. Generalnie, węglowodory aromatyczne bez podstawników podlegają degradacji trudniej niż związki z podstawnikami. Stosunkowo niewielka liczba drobnoustrojów wykazuje zdolność do degradacji **benzenu**. Głównym parametrem determinującym biodegradację tego związku jest dostępność tlenu (45). Główna droga biodegradacji benzenu, jak to m.in. stwierdzono dla szczepów *Pseudomonas rhodochrous* i *P. aeruginosa*, prowadzi przez katechol i kwas *cis,cis*-mukonowy (35). W proces biodegradacji tego związku mogą być również włączone enzymy ligninolityczne produkowane przez grzyby *Phanerochaete chrysosporium* (46). **Kwas benzoesowy**, jest metabolitem pośrednim degradacji węglowodorów aromatycznych, powstającym zarówno w warunkach tlenowych jak



Rys. 4. Drogi biodegradacji węglowodorów monoaromatycznych (43,44,49,50,54,58,59).

i beztlenowych (47). Z badań Feist i Hegeman (48), prowadzonych z udziałem szczepów *Pseudomonas putida* wynika, że związek ten degradowany jest *via* katechol, według szlaku *orto*-, choć w późniejszych publikacjach wskazuje się, że możliwa jest również droga typu *meta* (49,50). Loh i Chua (50) wskazują, że wybór drogi *orto* lub *meta* przez *P. putida* zależy od stężenia benzoenu. W stężeniach do 200 mg/l benzoenu degradowany jest głównie według szlaku *orto*. Przy stężeniach wyższych od 300 mg/l funkcjonuje także szlak *meta*.

Fenol, związek wysoce toksyczny, jest podstawowym metabolitem powstającym podczas rozkładu substancji aromatycznych. Stosunkowo łatwo ulega degradacji w dobrze natlenionym gruncie (51). Może być również silnie adsorbowany do czą-

stek gliny i transformowany do związków spolimeryzowanych (52). Fenol może być degradowany przez wiele gatunków drobnoustrojów, zwykle drogą przez katechol. Z badań Claußen i Smith (53) wynika, że grzyb strzępkowy *Scedosporium apiospermum* może degradować fenol zarówno według klasycznego szlaku przez katechol, jak również z wytworzeniem jako pierwszego metabolitu pośredniego – hydrochinonu.

p-Krezol, wg Bayly i wsp. (54) oraz Hopper i Taylor (55) może ulegać degradacji według szlaku prowadzącego przez 4-metylokatechol lub poprzez protokatechinian. Claußen i Smith (53) stwierdzili, że badany przez nich patogenny grzyb strzępkowy *Scedosporium apiospermum* przekształca *p*-krezol do 4-hydroksybenzyloalkoholu, 4-hydroksybenzoaldehydu i 4-hydroksybenzoesanu. Po czym, pod wpływem 3-monooksygenazy 4-hydroksybenzoesanowej (EC 1.14.13.1) tworzony jest protokatechinian. Ten ostatni, z udziałem 3,4-dioksygenazy (EC 1.13.11.3) ulega rozszczepieniu typu *orto* do 3-oksoadypinianu. Zdolność do asymilacji **toluenu** nie jest u drobnoustrojów zbyt powszechna. W warunkach tlenowych ulega on trudniej degradacji niż benzen. Biodegradacja toluenu może przebiegać według pięciu różnych szlaków. Szczepy *Burkholderia cepacia* G4, *Ralstonia pickettii* PKO1 i *Pseudomonas mendocina* KR1 utleniają toluen z udziałem specyficznych monooksygenaz (EC 1.14.13.-) tworząc *o*-, *m*- lub *p*-krezol (56-58). Krezole utworzone przez szczep G4 i PKO1 podlegają ponownej monooksygenacji, w wyniku której, powstaje 3-metylokatechol. Metabolit ten ulega rozszczepieniu typu *meta* (57). Szczep KR1 utlenia grupę metylową *p*-krezolu, tworząc 4-hydroksybenzoesan, który jest następnie rozszczepiany według szlaku *orto* (58). Z badań prowadzonych przez Gibson i wsp. (59) wynika, że szczepy *Pseudomonas putida* mogą utleniać toluen z udziałem dioksygenaz (EC 1.14.12.11) do *cis*-toluen dihydrodiolu, który to związek pod wpływem dehydrogenazy *cis*-toluen dihydrodiolowej (EC 1.3.1.19) zostaje przekształcony do 3-metylokatecholu, ulegającego rozszczepieniu typu *meta* z udziałem 2,3-dioksygenazy 3-metylokatecholowej. Biodegradacja toluenu przez drobnoustroje psychrofilne opisana jest w pracy Fewson (60). Wszystkie trzy izomery **ksylenu** mogą być degradowane przez drobnoustroje zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych, przy czym *p*- i *m*-ksyleny asymilowane są znacznie łatwiej niż izomery *orto*. Niektóre ze szczepów *Pseudomonas* mogą degradować ten związek na zasadach koutlenienia, w obecności toluenu (61) lub heksanu (62). Ilość drobnoustrojów bytujących w przyrodzie, zdolnych do degradacji izomerów ksylenu jest znacznie mniejsza od tych, degradujących benzen lub toluen. Mieszanina związków: benzen, toluen, ksyleny (BTX), może ulegać stosunkowo szybko degradacji w warunkach tlenowych i być wysoce oporna na rozkład w warunkach deficytu tlenu (45). Niekiedy, węglowodory te występując łącznie mogą powodować kompetycyjną inhibicję kompleksów enzymatycznych odpowiedzialnych za ich przyswajanie (61).

Warto odnotować fakt, że w określonych warunkach hodowli, niektóre mikroorganizmy mogą produkować enzymy uczestniczące nie tylko w degradacji obecnego w podłożu związku monoaromatycznego, ale i innych, pokrewnych węglowodorów.

Tak zatem podczas hodowli szczepu *P. gladioli* BSU 45124, hodowanym w podłożu z fenolem obserwowano indukcję enzymów biorących udział w degradacji toluenu.

9. Biodegradacja policyklicznych węglowodorów aromatycznych

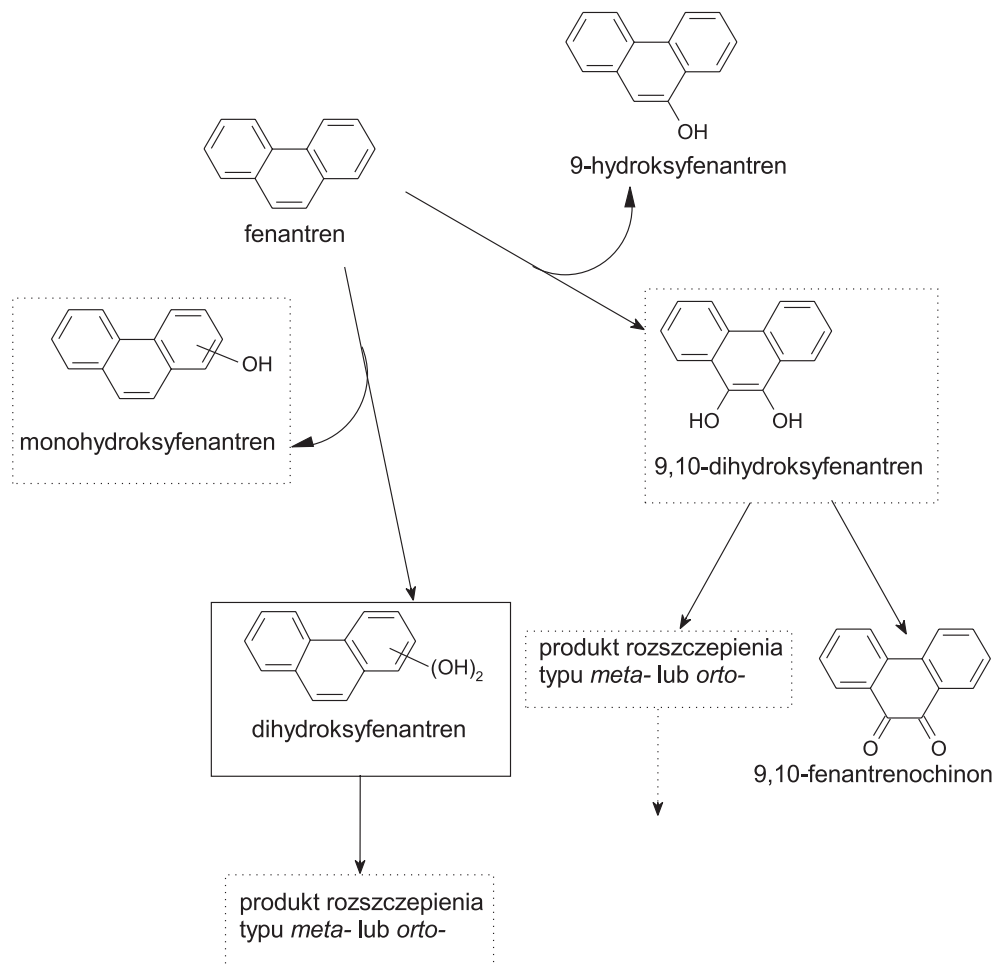
Policykliczne węglowodory aromatyczne (PAHs, ang. *poliaromatic hydrocarbons*) to substancje bardzo niebezpieczne, umieszczone na liście U.S. Environmental Protection Agency w grupie związków silnie rakotwórczych i mutagennych. PAHs to związki hydrofobowe, praktycznie nierozpuszczalna w wodzie. Ich lipofilność, oporność na degradację i genotoksyczność rośnie ze wzrostem liczby pierścieni (63,64). Związki te w środowisku mogą podlegać wielu przemianom: chemicznemu utlenianiu, fotolizie, hydrolizie, ulatnianiu, bioakumulacji, adsorpcji do cząstek gruntu oraz biodegradacji. Ta ostatnia, przebiegająca z udziałem drobnoustrojów stanowi podstawowy mechanizm odpowiedzialny za likwidację skażeń PAHs, zarówno w środowiskach wodnych jak i glebowych. Wiele drobnoustrojów zdolnych jest do atakowania policyklicznych węglowodorów aromatycznych, jednakże tylko niewielka ich liczba potrafi doprowadzić do pełnej mineralizacji (64). Zdolność do biodegradacji tych związków wykazują głównie bakterie gramujemne, np. szczepy *Pseudomonas* (36,65), *Alcaligenes* (37), *Agrobacterium* (66). Wśród drobnoustrojów wykazujących zdolność do biodegradacji PAHs w gruntach, na szczególną uwagę zasługują szczepy *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Gordonia* (67,68) i *Arthrobacter* (38). Szczepy *Mycobacterium* są aktywne w stosunku do naftalenu, fenantrenu, antracenu, fluoroantenu, pirenu i benzo(α)pirenu (39). Biodegradację pirenu prowadzić mogą szczepy *Rhodococcus* (68) oraz *Bacillus subtilis* (66). Węglowodory od naftalenu do benzo(a)pirenu mogą być również degradowane z udziałem drożdży, cyjanobakterii, okrzemek i eukariotycznych glonów (69). Związkami pośrednimi metabolizmu PAHs z udziałem fotoautotrofów, cyjanobakterii i glonów są zarówno *cis*- jak i *trans*-hydrodirole (70). Wśród grzybów wykazujących zdolność do detoksykacji i asymilacji PAHs wymienia się ligninolityczne grzyby *Cunninghamella elegans* (64), *Rhizoctonia solani*, *Trametes versicolor*, *Chrysosporium lignorum*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium tordum*, *Sclerotium rolfsii* i *Trichoderma harzianum* (66) oraz grzyby białej zgnilizny *Phanerochaete chrysosporium* (71) i *Bjerkandera* (72). Zwykle organizmy prokariotyczne utleniają PAHs z udziałem dioksygenaz, włączając dwa atomy tlenu do substratu, w wyniku czego powstają *cis*-hydrodirole, przekształcone następnie do odpowiednich związków dihydroksylowych. Geny bakterii odpowiedzialne za początkowe utlenienie łańcucha aromatycznego zlokalizowane są w plazmidach (43). U grzybów natomiast, utlenienie pierścienia aromatycznego zachodzi najczęściej przy udziale monooksygenaz (związanych z cytochromem P-450), które włączają jeden atom tlenu do substratu, w wyniku czego powstają tlenki arenów. Reakcje ich hydroksylacji prowadzą do utworzenia *trans*-dihydrodioli i fenoli (43). Generalnie uważa się, że celem prowadzonej przez grzyby reakcji hydroksylacji pierścienia aro-

matycznego, jest detoksykacja PAH, podczas gdy przyłączenie dwóch atomów węgla, jakie ma miejsce w przypadku bakterii, ma na celu przygotowanie pierścienia do rozerwania, a tym samym do dalszej degradacji. Po hydroksylacji jednego z pierścieni następuje jego rozszczepienie.

W większości przypadków kolejne pierścienie ulegają rozszczepieniu typu *orto*, nieco rzadziej ma miejsce rozszczepienie typu *meta*. Po przekształceniu fragmentów rozszczepionego pierścienia do kwasu pirogronowego i dwutlenku węgla, zostaje w podobny sposób zaatakowany kolejny pierścień poliarenu (18,65). Czynniki determinującymi utlenienie PAHs w środowisku są: poziom sorpcji węglowodorów w matrycy gleby, obecność surfaktantów, dostępność tlenu i wody. Szybkość biodegradacji pozostaje również funkcją rozpuszczalności substratu. Wyższa rozpuszczalność czyni te związki z jednej strony łatwiej degradowalnymi, a z drugiej bardziej toksycznymi.

Węglowodory takie jak **fenantren**, **fluoroanten**, mogą stanowić jedyne źródło węgla i energii tylko dla nielicznych szczepów bakterii. Zaobserwowano natomiast, że mogą one być degradowane kometabolicznie razem z PAHs o mniejszej liczbie pierścieni, przy czym koutlenie PAHs o niższym ciężarze cząsteczkowym, np. fluorenu i fenantrenu zachodzi łatwiej niż węglowodorów cięższych, np. benzo(a)antracenu czy pirenu. Niewiele dotąd wiadomo o mechanizmach biodegradacji mieszanin węglowodorów poliaromatycznych. Niekiedy po dodaniu do mieszaniny PAHs dodatkowego poliarenu obserwuje się zjawisko zatrzymania degradacji wszystkich składników mieszaniny. Zjawisko to określane jest w literaturze terminem antagonizmu substratowego (73). Ogromną rolę w biodegradacji mieszanin PAHs odgrywa współdziałanie drobnoustrojów o uzupełniających się uzdolnieniach metabolicznych. Wprowadzenie do mieszaniny hodowlanej dodatkowego drobnoustroju może znieść efekt obserwowanej wcześniej inhibicji (73).

Wśród PAHs najbardziej toksyczny jest **naftalen** i jego alkilowe pochodne co może wynikać między innymi z dużej rozpuszczalności tych związków w wodzie. Obecność naftalenu może powodować ograniczenie degradacji innych składników mieszaniny PAHs. Zdolność do degradacji naftalenu wykazują bakterie, głównie z rodzaju *Pseudomonas* oraz grzyby z rodzaju *Candida*, *Debaryomyces* (74,75). Grzyby metabolizują naftalen głównie z udziałem w pierwszym stadium monooksygenazy związanej z cytochromem P-450 (76). Tak jak wykazano dla szczepu *Burkholderia cepacia* F297 enzymy włączone w proces biodegradacji naftalenu nie są silnie specyficzne i mogą również uczestniczyć w procesie degradacji fluorenu, metylnaftalenu, fenantrenu, antracenu i dibenzotiofenu (42,77). Biodegradację **antracenu** z udziałem bakterii rozpoczyna reakcja hydroksylacji pierścienia aromatycznego prowadząca do utworzenia 1,2-dihydroksyantracenu. Pierścień aromatyczny zostaje rozerwany w pozycji *meta* w wyniku czego powstaje kwas 4-(2-hydroksynafto-3-yl)2-oxobut-3-enowy (78). Związek ten zostaje przekształcony kolejno do 6,7-benzokumaryny i kwasu 2-hydroksy-3-naftenowego. Następny etap biodegradacji przebiega podobnie jak dla naftalenu, z utworzeniem salicylanu i katecholu. W badaniach prowa-



Rys. 5. Drogi biodegradacji fenantrenu (86).

dzonych przez Dean-Ross i wsp. (79) wskazano, że szczepy *Rhodococcus* mogą rozszczepiać pierścień 1,2-dihydroksyantracenu nie tylko według szlaku typowego dla bakterii gramujemnych, czyli typu *meta* (z wytworzeniem 6,7-benzokumaryny, ale i typu *orto*, charakterystycznego dla bakterii gramododatnich, z wytworzeniem dikarboksyłowego kwasu 3-(2-karboksywinył) naftenowego.

Związkami wysoce toksycznymi są **benzo(a)piren** i **benzo(a)antracen**. Benzo(a)piren jest degradowany głównie przez drożdże *Candida* (75), grzyby strzępkowe *Cunninghamella* i *Aspergillus* (80) oraz grzyby białej zgnilizny *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* i *Bjerkandera adusta* (81). Peroksydazy produkowane przez szczepy *P. chrysosporium* mogą atakować pierścienie nie tylko benzo(a)pirenu, ale i antracenu, pirenu i fenantrenu (82). Zdolność do degradacji benzo(a)pirenu wy-

kazują również nieliczne szczepy bakterii, m.in. *Mycobacterium*, *Pseudomonas* i *Flavobacterium* (83). Z badań prowadzonych przez Poglazova i wsp. (84) wynika, że szczepy *Bacillus megaterium* mogą kumulować benzo(a)piren w cytoplazmie w formie połączeń z lipidami. Podstawowym mechanizmem umożliwiającym degradację tego związku jest kometabolizm. Zjawisko to obserwowano w podłożach zawierających jako kosubstrat fenantren (85). Degradacji **fenantrenu** natomiast może sprzyjać obecność fluorenu (73). W 1994 r. Trenz i wsp. (41) odkryli nowy szlak biodegradacji fenantrenu funkcjonujący u szczepu *Brevibacterium* sp. DPO1361. W wyniku hydroksylacji w pozycji C-9 tworzy się 9-fluorenol, z którego po dehydrogenacji powstaje 9-fluorenon. W wyniku rozerwania pierścienia 9-fluorenonu z udziałem dioksygenazy powstaje 1,10-dihydroksyfluorenon. W 2003 r. Herwijnen i WSP. (86) wyizolowali szczep *Sphingomonas* LB126 wykazujący zdolność do kometabolicznej degradacji fenantrenu, fluoroantenu, antracenu i dibenzotiofenu. Identyfikacja 9-fluorenolu i 9-fluorenonu podczas biodegradacji fluorenu wskazywała, że szczep LB126 rozkłada fenantren wg szlaku odkrytego wcześniej przez Trenz i wsp. (41) i Grifoll i wsp. (42). Szlak biodegradacji fluorenu przedstawiono na rysunku 5. Podatność na degradację węglowodorów poliaromatycznych z podstawnikami zależy od ilości i długości podstawników. Podstawniki dłuższe niż grupa etylenowa, są usuwane w drodze β -oksydacji (31). Rozerwanie pierścienia zachodzi łatwiej gdy do pierścienia dołączona jest jedna grupa metylowa, liczne podstawniki czynią związek bardziej opornym na biodegradację (87).

10. Oksygenazy

Wiadomo, że zapotrzebowanie na tlen drobnoustrojów aerobowych związane jest głównie z funkcjonowaniem fosforylacji oksydacyjnej, w ramach której, generowana jest energia dla procesów życiowych komórki. Zaledwie od 5 do 10% ogólnej puli tlenu wiązane jest w komórce poza tym mechanizmem, z udziałem wyspecjalizowanej grupy enzymów zwanych oksygenazami. W obecności węglowodorów, związków silnie zredukowanych, gdzie reakcją inicjującą ich asymilację jest przyłączenie molekularnego tlenu do cząsteczki węglowodoru, ilość tlenu wiązane-go w komórce z udziałem oksygenaz może dochodzić do 30% (88). Oksygenazy są typowymi enzymami indukcyjnymi. Podstawowymi substratami dla tych enzymów są węglowodory i ligniny. W wyniku działania oksygenaz powstają związki hydroksylowe lub karbonylowe, zwykle lepiej rozpuszczalne w wodzie i tym samym łatwiej degradowalne od związków wyjściowych. Wyróżnia się dwie zasadnicze grupy oksygenaz: dioksygenazy i monooksygenazy. Dioksygenazy przyłączają dwa atomy tlenu do molekuly organicznego substratu, monooksygenazy – jeden atom tlenu, z drugiego tworzona jest cząsteczka wody. Główne rodzaje **dioksygenaz** to: 1) dioksygenazy związane z NADH lub NADPH, których zadaniem jest hydroksylacja substratu oraz 2) dioksygenazy rozszczepiające pierścień aromatyczny. Oksygenazy związane

z NAD(P)H (hydroksylujące) to wieloskładnikowe systemy enzymatyczne, zawierające dwie do czterech podjednostek. Reduktaza flawoproteinowa, białko żelazowo-siarkowe i ferredoksyna stanowią komponenty odpowiedzialne za transport elektronów; reakcję hydroksylacji prowadzi terminalna oksigenaza zawierająca białko Rieskie'go. Każda z podjednostek zawiera w grupie prostetycznej żelazo (64). Specyficzność substratowa enzymu zależy w dużej mierze od budowy białka żelazowo-siarkowego (89). Z badań sekwencji nukleotydów odpowiedzialnych za syntezę tego wieloskładnikowego systemu enzymatycznego przez różne szczepy bakterii wynika, że sekwencje te są identyczne u 90% badanych pod tym kątem szczepów bakterii. Mniejszą homologię w sekwencji genów stwierdzono jedynie w przypadku szczepów *Comamonas testosteroni* (90) i *Nocardioides* sp. (91). Zbadane dotychczas dioksygenazy hydroksylujące związki aromatyczne sklasyfikować można w trzech grupach:

1. Dioksygenazy zawierające 4 podjednostki, np. dioksygenaza benzenowa (EC 1.14.12.3), toluenowa (EC 1.14.12.11), bifenyłowa (EC 1.14.99.-) i naftalenowa (EC 1.14.12.12). Komponentami enzymu są: reduktaza zawierająca flawoproteinę i białko żelazowo-siarkowe oraz ferredoksyna i terminalna oksigenaza. Przypuszcza się, że enzymy te mogą również atakować fenantren i antracen. W wyniku transformacji tych substratów powstają odpowiednie *cis*-dihydrodiol.

2. Dioksygenaza benzoesanowa (EC 1.14.12.10) i metylobenzoesanowa (EC 1.14.12.-) zawierająca trzy podjednostki (reduktazę flawoproteinową, ferredoksynę oraz terminalną oksigenazę). Przy jej udziale hydroksylacja kwasu benzoesowego zachodzi w pozycji 1 i 2.

3. Dioksygenazy zawierające dwie podjednostki, np. dioksygenaza ftalanowa (EC 1.14.12.7), hydroksylująca pierścień ftalanu w pozycji 4 i 5. Budowa tego enzymu wyraźnie się różni od budowy kompleksów już wymienionych.

Powstałe w wyniku działania dioksygenaz hydroksylujących *cis*-dihydrodiol ulegają kolejnym reakcjom utlenienia z udziałem dehydrogenaz. Powstałe pod ich wpływem dihydroksy-pochodne (katechol, kwas protokatechowy) stanowią odpowiednie struktury dla ataku dioksygenaz rozszczepiających pierścień aromatyczny. Dioksygenazy te zawierają w centrum aktywnym żelazo i nie wymagają kofaktorów. Rozszczepienie *orto* zachodzi z udziałem 1,2-dioksygenazy katecholowej (EC 1.13.11.1) lub 3,4-dioksygenazy protokatechinianowej (EC 1.13.11.3). Pierwsza z nich utlenia katechol do kwasu *cis,cis*-mukonowego (59,92), druga przekształca protokatechinian do kwasu beta-karboksy-*cis,cis*-mukonowego. Enzymy te kodowane są chromosomalnie. Przykładem dioksygenaz rozszczepiających typu *meta* może być 2,3-dioksygenaza katecholowa (EC 1.13.11.2), 2,3-dioksygenaza protokatechinianowa, i 4,5-dioksygenaza protokatechinianowa (EC 1.13.11.8). Enzymy te kodowane są w plazmidach. W wyniku ich działania powstają odpowiednio: semialdehyd 2-hydroksymukonowy, semialdehyd 2-hydroksy-5-karboksymukonowy i semialdehyd 2-hydroksy-4-karboksymukonowy. Rozszczepienie typu *meta* ma miejsce podczas biodegradacji toluenu (93,94), 1,2-dihydroksynaftalenu i antracenu. Szczególny przykład może stano-

wić 1,2-dioksygenaza gentyzynianowa (EC 1.13.11.4), przy udziale której dochodzi do rozerwania pierścienia między węglem z podstawioną grupą karboksylową a węglem z grupą -OH . W wyniku rozszczepienia kwasu gentyzynowego powstaje kwas malonylopirogronowy (94-96).

Monooksygenazy to liczna grupa enzymów włączających jeden atom tlenu do molekuly związku organicznego, przy jednoczesnym związaniu drugiego atomu tlenu w cząsteczce wody. Ponieważ utlenieniu ulegają jednocześnie dwa substraty, enzymy te nazywane są również oksygenazami mieszanymi. Do ich określenia używa się również terminu – hydroksylazy. Główna grupa monooksygenaz to monooksygenazy alkanów, utleniające terminalne grupy metylowe alkanów do alkoholi pierwszorzędowych. Monooksygenazy grzybów, związane z cytochromem P-450 przekształcają związki aromatyczne do tlenków arenów, które są dalej metabolizowane według dwóch alternatywnych szlaków. W pierwszym, dzięki działaniu hydrolazy epoksydowej, powstają *trans*-dihydrodiole (59,64). W drugim szlaku następuje izomeryzacja tlenków arenów do monohydroksylowanych pochodnych (fenoli). Fenole są następnie hydroksylowane w pozycji *orto* lub *para* tworząc katechole, te z kolei są rozszczepione z udziałem dioksygenaz. Mechanizm katalizy z udziałem monooksygenaz bakteryjnych jest nieco inny niż monooksygenaz eukariontów. Enzymy te szczególnie chętnie atakują związki aromatyczne z podstawnikami. Przykładowo, monooksydaza fenolowa (EC 1.14.13.7) i 3-monooksygenaza 4-hydroksybenzoesanowa (EC 1.14.13.2) po przyłączeniu nowych grup hydroksylowych w pozycji *orto* do podstawników już istniejących prowadzą do powstania w pierwszym przypadku – katecholu, w drugim – protokatechinianu (96). Inne monooksygenazy mogą przyłączać grupę hydroksylową w pozycji *para*.

11. Podsumowanie

Analizując dane literaturowe na temat dróg biodegradacji węglowodorów ropy naftowej w warunkach tlenowych, stwierdzić można, że główną rolę w tych procesach odgrywają oksygenazy odpowiedzialne za włączanie tlenu cząsteczkowego do molekuly węglowodoru i uczestniczące w reakcjach związanych z rozszczepieniem pierścienia aromatycznego węglowodoru. Realizacja podstawowych funkcji życiowych komórki zależy w dużym stopniu od przemian odbywających się w ramach β -oksydacji. Głównymi szlakami, według których może zachodzić mikrobiologiczna degradacja węglowodorów ropy naftowej w warunkach tlenowych są:

1. Terminalna oksydacja – podczas której, insercja aktywnego tlenu zachodzi w wolnym końcu alkilowego łańcucha węglowodoru z utworzeniem alkoholu, aldehydu i następnie do kwasu tłuszczowego. Kwasy tłuszczowe są degradowane na drodze β -oksydacji (rys.1).

2. Diterminalna oksydacja polegająca na przyłączeniu tlenu na obu końcach alkanu (α i ω), co prowadzi do otrzymania kwasu dikarboksylowego (rys. 1).

3. β -oksydacja, podczas której, degradacji ulegają kwasy tłuszczowe. Po związaniu się z koenzymem A, są degradowane do kwasów krótszych o dwa atomy węgla i acetylo-CoA.

4. Subterminalna oksydacja, w ramach której dochodzi do utlenienia wewnętrznych atomów węgla w łańcuchu węglowodorów alifatycznych. Reakcje takie obserwowano zarówno u bakterii jak i grzybów. Z drugorzędowych alkoholi tworzone są ketony i estry (rys. 1).

5. Utlenienie podwójnych wiązań. Szczególnie chętnie tą drogą degradowane są terminalne alkeny. Pośrednikami są epoksydy i diole. Reakcje tego typu mogą również zachodzić u alkenów zawierających podwójne wiązania w środku łańcucha i prowadzą one do powstania nienasyconych kwasów tłuszczowych (rys. 1).

6. Oksydatywne rozszczepienie pierścienia aromarycznego. Dioksygenazy włączając aktywny tlen tworzą *cis*-diolę lub *trans*-diolę. Te drugie tworzone są częściej przez organizmy eukariotyczne. Następnym etapem jest utworzenie nienasyconego kwasu lub kwasu dikarboksylogo. Struktury rozerwanego pierścienia są następnie degradowane w drodze β -oksydacji (rys. 4).

7. Cytronelowa droga. Szlak ten uaktywnia się u pewnych szczepów *Pseudomonas* i *Acinetobacter* (21) podczas biodegradacji węglowodorów rozgałęzionych (88). Reakcję tę prowadzi karboksylaza związana z geranylo-koenzymem A (rys. 3). Dalsze utlenienie pośredników zachodzi w ramach β -oksydacji.

8. ω -oksydacja zachodząca głównie w przypadku alkanów rozgałęzionych. Podczas ω -oksydacyjnej degradacji takich związków jak pristan lub fitan, tworzą się kwasy dikarboksylogo, zamiast jedynie monokarboksylogo, jak przy typowej β -oksydacji (19).

9. Kometabolizm – mechanizm umożliwiający utlenienie m.in. cykloalkanów i związków poliaromatycznych (rys. 2 i 3).

Mimo intensywnych badań i niewątpliwie ogromnego postępu w dziedzinie odkrywania nowych dróg metabolicznych u różnorodnych gatunków drobnoustrojów, pozostaje świadomość, że w procesach rozkładu mieszanin węglowodorów ogromną rolę odgrywają mało poznane do dziś zjawiska komensalizmu i kometabolizmu. Znajomość tych mechanizmów jest niezmiernie ważna dla opracowania efektywnych technologii bioremediacji środowisk skażonych substancjami ropopochodnymi.

Literatura

1. Premuzic E. T., Lin M. S., Racaniello L. K., Manowitz B., (1993), *Dev. Petrol. Sci. (Microbial Enhancement of Oil Recovery: Recent Advances)*, 39, 37-54.
2. Balba M. T., Al-Awadhi N., Al-Daher R., (1998), *J. Microbiol. Methods*, 32, 155-164.
3. Hanson K. G., Nigam A., Kapadia M., Desai A., (1997), *Curr. Microbiol.*, 35, 191-193, *Microbial Ecology*, vol 12.
4. Watkinson R. J., Morgan P., (1990), *Biodegradation*, 1, 79-92.
5. Warhurst A. M., Fewson C. A., (1994), *Crit. Rev. Biotechnol.*, 14, 29-73.
6. Chang J. H., Chang Y. K., Ryu H. W., Chang H. N., (2000), *FEMS Microbiol. Lett.*, 182, 309-312.

7. Yumoto I., Nakamura A., Iwata H., Kojima K., Kusumoto K., Nodasaka Y., Matsuyama H., (2002), *Intern. J. System. Evolut. Microbiol.*, 52, 85-90.
8. Alvarez H. M., (2003), *Int. Biodeter. Biodeg.*, 52, 35-42.
9. Beam H. W., Perry J. J., (1974), *J. Bacteriol.*, 118, 394-399.
10. Alvarez H. M., Luftmann H., Silva R. A., Cesari A. C., Viale A., Waltermann M., Steinguchel A., (2002), *Microbiology*, 148, 1407-1412.
11. Yadov J. S., Reddy A., (1993), *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 756-762.
12. Liao W. L., Tseng D-H., Tsai Y-C., Chang S-C., (1997), *Wat. Sci. Tech.*, 35, 8, 255-264.
13. Widdel F., Rabus R., (2001), *Curr. Opin. Biotechnol.*, 12, 259-276.
14. Heider J., Spormann A. M., Beller H. R., Widdel F., (1999), *FEMS Microbiol. Rev.*, 22, 459-473.
15. Rockne K. J., Strand S. E., (2001), *Wat. Res.*, 35, 1, 291-299.
16. Fredericks K. M., (1966), *Nature (London)*, 209, 1047-1048.
17. Cerniglia C. E., (1981), *Rev. Biochem. Toxicol.*, 3, 321-361.
18. Atlas R. M., (1981), *Microbiol. Rev.*, 45, 180-209.
19. Markovetz A. J., (1971), *Crit. Rev. Microbiol.*, 1, 225-237.
20. Atlas R. M., (1978), *BioScience*, 28, 387-391.
21. Fall R. R., Brown J. L., Schaeffer T. L., (1979), *Appl. Environ. Microbiol.*, 38, 715-722.
22. Cooney J. J., Silver S. A., Beck E. A., (1985), *Microb. Ecol.*, 11, 127-137.
23. Pirnik M. P., (1977), *Crit. Rev. Microbiol.*, 5, 413-422.
24. Nakajima D., Kojima E., Iwaya S., Suzuki J., Suzuki S., (1996), *Environ. Sci Technol.*, 30, 1675-1679.
25. Cox D. P., Williams A. L., (1980), *Appl. Environ. Microbiol.*, 39, 320-326.
26. Berekaa M. M., Steinbuchel A., (2000), *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 10, 4462-4467.
27. Koma D., Hasumi F., Yamamoto E., Ohta T., Chung S-Y., Kubo M., (2001), *J. Biosci. Bioeng.*, 91, 94-96.
28. Koma D., Hasumi F., Chung S-Y., Kubo M., (2003), *J. Biosci. Bioeng.*, 95, 641-644.
29. Koma D., Sakashita Y., Kubota K., Fujii Y., Hasumi F., Chung S. Y., Kubo M., (2005), *Appl. Microbiol. and Cell Physiology*, 66, 92-99.
30. Donoghue N. A., Griffin M., Norris D. B., Trudgill P. W., (1976), *Proc. 3rd Int. Biodegradation Symp.*, (Aug. 17-23, 1975), Eds. Kingston R. I., Sharply J. M., Kaplan A. M., Applied Science Publishers, London, 43-56.
31. Hornick S. B., Fisher R. H., Paolini P. A., (1983), *Land Treatment of Hazardous Wastes*, Eds. Parr J. F., Marsh P. B., Kla J. M., Noyes Data Corp., Park Ridge, NJ., 321-337.
32. Dutta T. K., Harayama S., (2001), *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 1970-1974.
33. Ratledge C., (1978), *Developments in Biodegradation of Hydrocarbons*, Ed. Watkinson R.J., Applied Science Publishers, London, 1-46.
34. Kiyohara H., Nagao K., (1978), *J. Gen. Microbiol.*, 105, 69-75.
35. Hou C. T., (1982), *CRC Microbial Transformations of Bioactive Compounds*, vol. 1, Ed. Rosazza J. P., CRC Press, Boca Raton, FL., 81-107.
36. Mueller J. G., Chapman P. J., Blattmann B. O., Pritchard P. H., (1990), *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1079-1086.
37. Weissenfels W. D., Beyer M., Klein J., (1990), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 32, 479-484.
38. Keuth S., Rehm H. J., (1991), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 34, 804-808.
39. Guerin W. F., Jones G. E., (1988), *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 937-944.
40. Sutherland J. B., Selby A. L., Freeman J. P., Evans F. E., Cerniglia C. E., (1991), *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 3310-3316.
41. Trenz S. P., Engesser K-H., Fischer P., Knackmuss H. J., (1994), *J. Bacteriol.*, 176, 789-795.
42. Grifoll M., Selifonov S. A., Chapman P. J., (1994), *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 2438-2449.
43. Cerniglia C. E., Yang S. K., (1984), *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 119-124.
44. Harwood C. S., Parales R. E., (1996), *Annu. Rev. Microbiol.*, 50, 553-590.
45. Barker J. F., Patrick G. C., Major D., (1987), *Ground Water Monit. Rev. Winter*, 64-71.
46. Paszczynski A., Crawford R. L., (1995), *Biotechnol. Progr.*, 11, 368-379.
47. Caldwell M. E., Suflita J. M., (2000), *Environ. Sci. Technol.*, 34, 1216-1220.
48. Feist C. F., Hageman G. D., (1973), *J. Bacteriol.*, 100, 869-877.

49. Nakazawa T., Yokota T., (1973), *J. Bacteriol.*, 115, 262-267.
50. Loh K-C., Chua S-S., (2002), *Enzyme and Microbial Technology*, 30, 620-626.
51. Baker M. D., Mayfield C. I., (1980), *Water Air Soil Pollut.*, 13, 411-424.
52. Sawhney B. L., Kozloski R. P., (1984), *J. Environ. Qual.*, 13, 349-352.
53. Claußen M., Smith S., (1998), *Res. Microbiol.*, 149, 399-406.
54. Bayly R. B., Dagley S., Gibson D. T., (1966), *Biochem J.*, 101, 293-301.
55. Hopper D. J., Taylor D. G., (1975), *J. Bacteriol.*, 122, 1-6.
56. Newman L. M., Wackett N., (1995), *Biochemistry*, 34, 14066-14076.
57. Olsen G. J., Lane D. J., Giovannoni S. J., Pace N. R., Stahl D. A., (1986), *Annu. Rev. Microbiol.*, 40, 337-365.
58. Whited G. M., Gibson D. T., (1991), *J. Bacteriol.*, 173, 3010-3016.
59. Gibson D. T., (1993), *J. Industrial Microbiology*, 12, 1-12.
60. Fewson C. A., (1981), *Biodegradation of aromatics with industrial relevance*, in: FEMS Symposium No. 12. Microbial Degradation of Xenobiotics and Recalcitrant Compounds, Eds. Leisinger T., Hutter R., Cook A., Nuesch J., Academic Press, New York, 12, 141-179.
61. Chang M.-K., Voice T. C., Criddle C. S., (1993), *Biotechnol. Bioeng.*, 41, 1057-1065.
62. Jamison V. W., Raymond R. L., Hudson J. O., Jr., (1976), *Biodegradation of high-octane gasoline*, in: Proc. 3rd Int. Biodegradation Symp., Eds. Sharpley J. M., Kaplan A. M., Elsevier, New York, 187-196.
63. Pollut. Control Fed Park K. S., Sims R. C., Doucette W. J., Matthews J. E., (1988), *J. Water.*, 60, 1822-1825.
64. Cerniglia C. E., (1992), *Biodegradation*, 3, 351-368.
65. Williams P. A., Sayers J. R., (1994), *Biodegradation*, 5, 195-217.
66. Mahmood S. K., Rao P. R., (1993), *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 50, 486-491.
67. Cerniglia C. E., Gibson D. T., (1979), *J. Biol. Chem.*, 254, 12174-12180.
68. Field J. A., Boelsma F., Baten H., Rulkens W. H., (1995), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 44(1-2), 234-240.
69. Field J. A., de Jong E., Feijoo-Costa G. F., de Bont J. A. M., (1993), *Trends Biotechnol.*, 11(2), 44-49.
70. Kaestner M., Breuer-Jammali M., Mahro B., (1994), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 41, 267-273.
71. Walter U., Beyer M., Klein J., Rehm H. J., (1991), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 34, 671-676.
72. Narro M. L., Cerniglia C. E., van Baalen C., Gibson D. T., (1992), *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 1351-1359.
73. Bouchez M., Blanchet D., Vandecasteele V-P., (1995), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43, 156-164.
74. Bumpus J. A., (1989), *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 154-158.
75. Dhawale S. W., Dhawale S. S., Dean-Ross D., (1992), *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 3000-3006.
76. Field J. A., Baten H., Boelsma F., Rulkens W. H., (1996), *Environ. Technol.*, 17(3), 317-323.
77. Kelley I., Freeman J. P., Cerniglia C. E., (1991), *Biodegradation*, 1, 283-290.
78. Cerniglia C. E., Crow S. A., (1981), *Arch. Microbiol.*, 129, 9-13.
79. Dean-Ross D., Moody J. D., Freeman J. P., Doerge D. R., Cerniglia C. E., (2001), *FEMS Microbiol. Lett.*, 204, 205-211.
80. Cerniglia C. E., Hebert R. L., Szaniszló P. J., Gibson D. T., (1978), *Arch. Microbiol.*, 117, 135-143.
81. Annweiler E., Richnow H. H., Antranikian G., Hebenbrock S., Garms C., Franke S., Francke W., Michaelis W., (2000), *Appl. Environ. Microbiol.*, 43, 454-457.
82. Evans W. C., Fernley H. N., Griffiths E., (1965), *Biochem. J.*, 95, 819-831.
83. Trzesicka-Mlynarz D., Ward O. P., (1995), *Can. J. Microbiol.*, 41, 470-476.
84. Poglazova M. M., Fedoseeva G. E., Khesina A. J., Meissel M. N., Shabad L. M., (1967), *Life Sci.*, 6, 1053-1062.
85. Sims R. C., Overcash M. R., (1983), *Residue Reviews*, 88, 1-68.
86. Herwijnen R., Wattiau P., Bastiaens L., Daal I., Jonker L., Gael D., Govers H. A. J., Parsons J. R., (2003), *Res. Microbiol.*, 154, 199-206.
87. Gibson D. T., Parales R. E., (2000), *Curr. Opinion in Biotechnol.*, 11, 236-243.
88. Bausum H. T., Taylor G. W., (1986), *Literature Survey and Data Base Assessment: Microbial Fate of Diesel Fuels and Fog Oils*. U.S. Army Medical Bioengineering Research and Development Laboratory, Fort Detrick, Frederick M. D., Technical Report 8408. ADA167799.

89. Ensley B. D., (1994), *Current Opinion in Biotechnology*, 5, 249-252.
90. Goyal A. K., Zylstra G. J., (1996), *Appl. Environ Microbiol.*, 62, 230-236.
91. Iwabuchi T., Harayama S., (1997), *J. Bacteriol.*, 176, 2439-2443.
92. Ellis B., Harold P., Kronberg H., (1991), *Environ. Technol.*, 12, 447-459.
93. Zylstra G. J., Gibson D. T., (1991), *Genetic Engineering*, 13, 183-203; Ghisalba O., (1983), *Experientia*, 39, 1247-1257.
94. Miyauchi K., Adacht Y., Nagata Y., Takagi M., (1999), *J. Bacteriol.*, 181, 6712-6719; Fewson C.A., (1967), *J. Gen. Microbiol.*, 46, 255-266.
95. Ohtsubo Y., Miyauchi K., Kanda K., Hatta T., Kiyohara H., Senda T., Nagata Y., Mitsui Y., Takagi M., (1999), *FEBS Letters*, 395-398.
96. Xu L., Resling K., Lawson S. L., Babbit P. C., Copley S. D., (1999), *Biochemistry*, 38, 7659-7669.