

Irena MALISZEWSKA

Politechnika Wrocławska

Instytut Chemii Organicznej, Biochemii i Biotechnologii

50-370 Wrocław, ul. Wybrzeże Wyspiańskiego 27

## DEHALOGENAZY BAKTERII GLEBOWYCH

**Streszczenie.** W prezentowanej pracy zbadano dehalogenujące zdolności mikroflory glebowej. Stwierdzono, że dehalogenazy są szeroko rozpowszechnione w środowisku. Komórki bakterii mogą produkować dwa różne dehalogenujące systemy.

## DEHALOGENASES OF SOIL BACTERIA

**Summary.** In this paper the ability of soil bacteria to dehalogenate of various chloroorganic compounds was studied. Dehalogenating enzymes are widely distributed in the nature. Two dehalogenating systems may coexist in individual bacterial strain.

## WPROWADZENIE

Organiczne połączenia fluorowców (najczęściej chloru) stanowią grupę związków szeroko rozpowszechnionych w środowisku naturalnym. Biogennym źródłem chloropochodnych są morskie rośliny i zwierzęta (korale, gąbki), jak również rośliny lądowe [1]. Znaczne ilości tych substancji dostarczają wybuchy wulkaniczne, pożary lasów i stepów. Ogromne pokłady chloropochodnych znajdują się w torfie i tzw. substancjach huminowych. Jednakże szacuje się, że jedynie bioprodukcja chlorometanu ma znaczący udział w sumarycznej emisji tych związków do środowiska.

Głównym źródłem omawianej grupy chemikaliów jest działalność człowieka. Współczesny przemysł wytwarza wiele produktów zawierających organiczne połączenia chloru. Wśród nich znajdują się rozpuszczalniki organiczne, pestycydy, półprodukty wielu syntez chemicznych [2]. Ponadto oczyszczanie wody, a właściwie jej chlorowanie, stanowi źródło różnych halogenopochodnych [3]. W ostatnich latach dowiedziono, że niektóre chloropochodne wykazują działanie kancerogenne, mutagenne i teratogenne [4].

Jak do tej pory, proces biodegradacji tych substancji przedstawiono obszernie na przykładzie rozkładu aromatycznych halogenopochodnych. Mniej uwagi poświęcono alifatycznym związkom chlorowcoorganicznym. Mimo iż obecność prostego łańcucha węglowego znacznie ułatwia naukowcom modelowanie i analizę biochemiczną metabolizmu tych związków, dane dotyczące ich rozkładu przez mikroorganizmy są nadal

niewystarczające. Wiadomo, że część alifatycznych chloropochodnych jest odporna na biologiczny rozkład. Jednym z powodów tej odporności jest toksyczność tych substancji. Od wielu lat wiadomo, że zależy ona od obecności podstawników w cząsteczce. Związki chloroorganiczne są zazwyczaj bardziej toksyczne od swych niechlorowanych analogów. Wprowadzenie atomów chloru (ale także i innych fluorowców) do związku organicznego powoduje, że może się on stać mutageny. Mutagenność ta jest ściśle związana z powstawaniem, w czasie przemian katabolicznych, metabolitów pośrednich, zaburzających normalny metabolizm komórki. Przykładami takich związków są monoocetan i kwas  $\alpha$ -bromopropionowy, których toksyczne działanie w stosunku do bakterii *Escherichia coli* i *Enterobacter aerogenes* opisano jeszcze przed pierwszą wojną światową [5]. Dzisiaj wiadomo, że toksyczność tych związków jest wynikiem ich aktywacji w komórkach i powstawania elektrofilowych metabolitów pośrednich, zdolnych do kowalencyjnego wiązania się z różnymi strukturami, szczególnie z DNA [6]. Z drugiej zaś strony, toksyczność niektórych chlorowcopochodnych jest wynikiem hamowania przez te związki ważnych procesów metabolicznych, np. cyklu Krebsa.

Przypuszcza się również, że jednym z powodów trwałości tych substancji jest ich ksenobiotyczna struktura. Skoro jakieś związki nie są produkowane w sposób naturalny w środowisku, to nie istnieją szlaki metaboliczne, prowadzące do wykorzystania ich jako źródła energii lub powstające metabolity pośrednie nie są wykorzystywane w procesach biosyntezy. Jednakże istnieje wiele wyjątków. Tetrachloroeten czy 1,2-dichloroeten, mimo że nie są naturalnymi związkami, są dobrze degradowane przez niektóre mikroorganizmy [7, 8]. Liczne obserwacje potwierdzają przypuszczenia, że pojawienie się nowego związku w ekosystemie prowadzi do uruchamiania mechanizmów jego biodegradacji. Dotychczas zidentyfikowano kilkadziesiąt tlenowych i beztlenowych drobnoustrojów, które rozkładają organiczne związki chloru, jodu, fluoru i bromu do  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$  [9, 10, 11]. We wszystkich tych przypadkach decydującym etapem biodegradacji alifatycznych halogenopochodnych (oprócz chlorku winylu) jest ich dehalogenacja, czyli enzymatyczne rozerwanie wiązania węgiel-halogen. Dotychczas poznano i scharakteryzowano kilka różnych mechanizmów rozpadu wiązania węgiel-halogen [12]. Od wielu lat jednak wiadomo, że istnieje znacznie więcej mechanizmów rozrywania tych wiązań. Poznanie struktur dehalogenujących enzymów pozwoli zrozumieć przyczyny oporności niektórych związków na mikrobiologiczny rozkład. Ponadto otwiera drogę do badań nad adaptacją białek (enzymów) do ksenobiotycznych warunków.

Prezentowana praca jest wstępem do badań nad dehalogenującymi własnościami naturalnej mikroflory glebowej.

## MATERIAŁY I METODY

### Testowane związki chloroorganiczne

Do badań użyto następujących związków chloroorganicznych: 1-chloropropan, 1,2-dichloropropan, 1,3-dichloropropan, 1-chlorobutan, 2-chlorobutan, 1-chloropentan, 1,5-dichloropentan, 1-chlorodekan i 1,10-dichlorodekan, kwas dichlorooctowy, kwas 2-chloropropionowy, kwas 3-chloropropionowy, kwas 4-chloromasłowy oraz kwas 5-chlorowalerianowy.

### Isolacja mikroorganizmów zdolnych do dehalogenacji wybranych związków chloroorganicznych

W celu izolacji mikroorganizmów zdolnych do dehalogenacji wybranych chloropochodnych pobrano kilkanaście próbek gleby pochodzących z różnych ekosystemów (las, rowy przydrożne, łąka, pole uprawne, miejski trawnik itp.). Próbki gleby zawieszano w wodzie destylowanej i wytrząsano w temperaturze pokojowej przez 2 godziny. Następnie zawiesiny pozostawiano na 30 minut i 1 ml płynu nad osadu dodawano do 50 ml mineralnego podłoża o następującym składzie:  $K_2HPO_4$  7g,  $Na_2HPO_4$  0,5g,  $MgSO_4 \times 12 H_2O$  0,1g,  $(NH_4)_2SO_4$  1g, woda destylowana 1000 ml, pH 7,0-7,2. Podłoże mineralne zawierało 0,5% (v/v) jednego z badanych związków chloroorganicznych jako źródło węgla.

Hodowle prowadzono w temperaturze pokojowej z wytrząsaniem. Po 5 dniach z hodowli pobierano 1 ml płynu i dodawano go do świeżej pożywki zawierającej odpowiednie chloropochodne. Po upływie kolejnych 5 dni w przesączach pochodzących oznaczano stężenie jonów chlorkowych. Do dalszych badań wybrano te hodowle, w których stężenie jonów chlorkowych wynosiło powyżej 10  $\mu\text{g/ml}$ .

### Określanie dehalogenującej aktywności mikroorganizmów

Określanie dehalogenującej aktywności mikroorganizmów wobec różnych chloropochodnych prowadzono w buforze fosforanowym (0,1 M; pH 7,0) w temperaturze pokojowej. Do 50 ml buforu dodawano 50 mM badanego substratu i 0,5 g mokrej masy mikroorganizmu. Próby inkubowano przez 6 godzin z wytrząsaniem w szczelnie zamkniętych kolbach. Po tym czasie odwirowywano je (3000 obr./min.; 15 minut) i w płynach nad osadu oznaczano stężenie jonów chlorkowych. Próby kontrolne nie zawierały biomasy bakterii.

### Oznaczanie stężenia jonów chlorkowych

Oznaczanie stężenia jonów chlorkowych w płynach prowadzono według procedury opisanej przez Bergmanna i wsp. [13].

### Oznaczanie biomasy

Hodowle odwirowywano (3000 obr./min, 15 min). Uzyskane osady przemywano i suszono w temperaturze 105°C do stałej wagi. Biomagę drobnoustrojów podano w g/l pożywki.

## WYNIKI I WNIOSKI

Dzięki zastosowaniu tzw. hodowli wzbogaconej z pobranych próbek gleby wyizolowano 12 różnych kultur bakterii zdolnych do rozrywania wiązania C-Cl. Dehalogenujące mikroorganizmy izolowano ze wszystkich prób, niezależnie od ekosystemu, z którego pochodziły. Potwierdza to przypuszczenia, że zdolność do dehalogenacji chloropochodnych jest dosyć szeroko rozpowszechniona wśród drobnoustrojów, a wiązanie C-halogen nie ma ksenobiotycznego charakteru.

Dla celów doświadczalnych wyizolowane mikroorganizmy oznaczono kolejnymi cyframi arabskimi (od 1 do 12). Ich dehalogenujące własności zestawiono w tabelach poniżej.

Tabela 1  
Mikrobiologiczna dehalogenacja chloroalkanów

Szczep	Badane chloroalkany								
	1chl <sub>3</sub>	1,2chl <sub>3</sub>	1,3chl <sub>3</sub>	1chl <sub>4</sub>	2chl <sub>4</sub>	1chl <sub>5</sub>	1,5chl <sub>5</sub>	1chl <sub>10</sub>	1,10chl <sub>10</sub>
1	+(2)	+	+	++	++	-	-	-	-
2	+	-(1)	-	+	-	-	-	-	-
3	++(3)	-	-	+	+	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	+	+	+	+
5	-	-	-	-	-	+	+	+	+
6	-	-	-	-	-	+	-	+	-
7	+	+	+	+	+	-	-	-	-
8	+	+	+	+	+	-	-	-	-
9	+	+	+	+	+	-	-	-	-
10	++	+	+	+	++	-	-	-	-
11	++	+	+	+	++	-	-	-	-
12	+	-	-	+	-	+	-	+	-

(1chl<sub>3</sub>)-1-chloropropan; (1,2chl<sub>3</sub>)-1,2-dichloropropan; (1,3chl<sub>3</sub>)-1,3-dichloropropan; (1chl<sub>4</sub>)-1-chlorobutan; (2chl<sub>4</sub>)-2-chlorobutan; (1chl<sub>5</sub>)-1-chloropentan; (1,5chl<sub>5</sub>)-1,5-dichloropentan; (1chl<sub>10</sub>)-1-chlorodekan; (1,10chl<sub>10</sub>)-1,10-dichlorodekan;

(1) jony chlorkowe nicobecne; (2) stężenie jonów chlorkowych poniżej 10 µg/ml; (3) stężenie jonów chlorkowych powyżej 10 µg/ml.

Jak widać w powyższej tabeli, wśród chloropochodnych propanu najwięcej mikroorganizmów (dziewięć) było zdolnych do dehalogenacji monochloropochodnej. Równie dobrze dehalogenuwane były monochloropochodne butanu. Nieco gorzej uwalniany był chlor z chloropochodnych pentanu i dekanu. Jedynie cztery mikroorganizmy zdolne były do dehalogenacji 1-chloropentanu i 1-chlorodekanu, a dwa dehalogenuwały dichloropochodne tych alkanów.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że zdolności mikroorganizmów do dehalogenacji chloroalkanów zależały od długości łańcucha węglowodorowego (malały ze wzrostem) i liczby atomów chloru w cząsteczce. Łatwiej uwalniany był chlor z monochloropochodnych.

W tabeli 2 przedstawiono wyniki badań nad mikrobiologiczną dehalogencją chloropochodnych krótkołańcuchowych kwasów karboksylowych i 2-chloroetanolu.

Tabela 2  
Mikrobiologiczna dehalogenacja chlorokwasów i 2-chloroetanolu

Szczep	Badane chloropochodne				
	Kwas 1	Kwas 2	Kwas 3	Kwas 4	Chloroetanol
1	- <sup>(1)</sup>	-	++	+	-
2	+ <sup>(2)</sup>	+	-	-	+
3	++ <sup>(3)</sup>	+	++	-	+
4	++	+	++	-	++
5	+	+	++	++	-
6	+	+	++	++	-
7	-	-	++	++	-
8	-	-	++	+	-
9	-	-	++	+	-
10	+	+	++	-	+
11	+	+	++	-	+
12	+	+	++	-	+

(Kwas 1)- 2-chloropropionowy; (Kwas 2)- 3-chloropropionowy; (Kwas 3)- 4-chloromasłowy;  
(Kwas 4)- 5-chlorowalerianowy

(1) jony chlorkowe nieobecne; (2) stężenie jonów chlorkowych poniżej 10 µg/ml; (3) stężenie jonów chlorkowych powyżej 10 µg/ml.

Jak widać w tabeli 2, chloropochodne kwasu propionowego były dehalogenowane w podobnym stopniu, niezależnie od miejsca podstawienia atomu chloru (pozycja węgla 2 lub 3). Najlepiej dehalogenowany był kwas 4-chloromasłowy. Natomiast żaden z wyizolowanych mikroorganizmów nie był zdolny do odłączania atomów chloru w kwasie dichlorooctowym.

W następnym etapie badań sprawdzono, czy badane mikroorganizmy były zdolne do wykorzystywania chlorowanych substratów jako źródła węgla do wzrostu, czy jedynie do ich dehalogenacji. Wyniki badań zestawiono w tabelach 3 i 4.

Tabela 3

Przyrost biomasy mikroorganizmów w obecności chloroalkanów jako źródła węgla

Szczep	Przyrost biomasy (g/l)								
	1chl <sub>3</sub>	1,2chl <sub>3</sub>	1,3chl <sub>3</sub>	1chl <sub>4</sub>	2chl <sub>4</sub>	1chl <sub>5</sub>	1,5chl <sub>5</sub>	1chl <sub>10</sub>	1,10chl <sub>10</sub>
1	0,24	0,18	0,27	0,28	0,32	-	-	-	-
2	0,34	-	-	0,15	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	0,45	0,42	0,64	0,58
5	-	-	-	-	-	0,51	0,59	0,53	0,45
6	-	-	-	-	-	0,43	-	0,53	-
7	0,23	0,22	0,24	0,27	0,26	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	0,26	0,22	0,24	0,26	0,24	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	0,18	0,16	0,16	0,23	0,21	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	0,46	-	0,48	-

(1chl<sub>3</sub>)-1-chloropropan; (1,2chl<sub>3</sub>)-1,2-dichloropropan; (1,3chl<sub>3</sub>)-1,3-dichloropropan; (1chl<sub>4</sub>)-1-chlorobutan; (2chl<sub>4</sub>)-2-chlorobutan; (1chl<sub>5</sub>)-1-chloropentan; (1,5chl<sub>5</sub>)-1,5-dichloropentan; (1chl<sub>10</sub>)-1-chlorodekan; (1,10chl<sub>10</sub>)-1,10-dichlorodekan;

Jak widać w tabeli 3, zdolność do odłączania atomu(ów) chloru nie zawsze jest związana ze zdolnością mikroorganizmu do wykorzystywania substratu chloroorganicznego jako źródła węgla. Szczepy bakteryjne oznaczone symbolami 3, 8 i 10 efektywnie dehalogenowały chloropochodne propanu i butanu, natomiast nie wykorzystywały tych związków jako źródła węgla. Wydaje się, że chloropochodne pentanu i dekanu są lepszymi źródłami węgla niż krótszołańcuchowe alkany. Generalnie lepiej wykorzystywane do wzrostu są monochloropochodne.

Natomiast, jak pokazano w tabeli 4, wszystkie drobnoustroje zdolne do dehalogenacji chlorokwasów wykorzystywały je również jako źródło węgla. Najlepszym substratem wzrostowym okazał się kwas 4-chloromasłowy. Podobnie jak w przypadku chloroalkanów, 2-chloroetanol, mimo iż był dehalogenowany, nie zawsze mógł być wykorzystany do wzrostu (szczepy oznaczone numerami 2 i 3).

Tabela 4

Przyrost biomasy mikroorganizmów w obecności chlorokwasów i 2-chloroetanolu jako źródła węgla

Szczep	Przyrost biomasy (g/l)				
	Kwas 1	Kwas 2	Kwas 3	Kwas 4	Chloroetanol
1	-	-	0,82	0,65	-
2	0,37	0,45	-	-	-
3	0,45	0,34	0,76	-	-
4	0,32	0,45	0,72	-	0,34
5	0,43	0,34	0,62	0,54	-
6	0,25	0,23	0,75	0,65	-
7	-	-	0,54	0,53	-
8	-	-	0,81	0,53	-
9	-	-	0,81	0,64	-
10	0,41	0,32	0,72	-	0,23
11	0,42	0,43	0,43	-	0,24
12	0,24	0,34	0,54	-	0,25

(Kwas 1)- 2-chloropropionowy; (Kwas 2)- 3-chloropropionowy; (Kwas 3)- 4-chloromasłowy;  
(Kwas 4)- 5-chlorowalerianowy

W oparciu o obowiązującą klasyfikację dehalogenujących enzymów można stwierdzić, iż niektóre mikroorganizmy posiadają kilka różnych dehalogenujących systemów. Najczęściej jest to hydrolityczna dehalogenaza, aktywna w stosunku do halogenoalkanów i kwasów halogenoalkanowych i liaza halogenoalkoholowa - aktywna wobec 2-chloroetanolu (szczyepy 2, 3, 4, 10, 11, 12).

Ponadto stwierdzono, że:

- wszystkie szczepy bakteryjne, wykazujące zdolność do dehalogenacji i wzrostu na badanych chloroorganicznych związkach są mikroorganizmami gramujemnymi;
- wszystkie dehalogenujące enzymy są białkami wewnątrzkomórkowymi;
- wszystkie dehalogenazy są enzymami indukcyjnymi tzn. dla ujawnienia się ich aktywności w komórce konieczna jest obecność chloroorganicznego substratu;
- obecność dodatkowego substratu wzrostowego (np. glukozy) hamuje dehalogenującą aktywność mikroorganizmów.

## LITERATURA

1. Mastalerz P.: *Biogenne związki halogenoorganiczne*. Wiad. Chem. 52, 9, 1998.
2. Mastalerz P.: *Organiczne związki fluorowców w przyrodzie*. Wiad. Chem. 49, 117, 1995.
3. de Leer E.W.B.: *Aqueous chlorination products. The origin of organochlorine compounds in drinking and surface waters*. Delft University Press, Delft 1987.
4. Kruijf H.A.M., Kod H.J.: *Organic mikropollutants in drinking water and health*. Elsevier, Amsterdam 1985.
5. Penfold W.J.: *The inhibitory selective action on bacteria of bodies related to monochloroacetic acid*. J. Hygiene, 13, 35, 1913.
6. Slater J.H., Bull A.T., Hardman D.J.: *Microbial dehalogenation*. Biodegradation, 6, 181, 1995.
7. Meer J.R., de Vos W.M., Harayama S., Zehnder A.J.B.: *Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds*. Microbiol. Rev. 56, 677, 1992.
8. Pries F., Ploeg J.R., Dolfing J., Janssen D.B.: *Degradation of halogenated aliphatic compounds: the role of adaptation*. FEMS Microbiol. Rev. 15, 279, 1994.
9. Scholtz R., Schmuckle A., Cook A.M., Leisinger T.: *Degradation of eighteen 1-monohaloalkanes by *Arthrobacter* sp. strain HA1*. J. Gen. Microbiol. 133, 267, 1987.
10. Kohler-Staub B., Kohler H.P.E.: *Microbial degradation of  $\beta$ -chlorinated four-carbon aliphatic acids*. J. Bacteriol. 171, 1428, 1989.
11. Slater J.H.: *Biochemistry of microbial degradation*. Kluwer Acad. Publ. 1994.
12. Maliszewska I.H.: *Mikrobiologiczna dehalogenacja*. Post. Mikrobiol. 2, 233, 1998.
13. Bergmann J.G., Sanik J.: *Determination of trace amounts of chlorine in naphtha*. Anal. Chem. 29, 241, 1957.

**Abstract**

Halogenated compounds occur widely in the biosphere either as natural products or as xenobiotic compounds entering the environment with the use of herbicides or pesticides. In recent years some microorganisms have been reported capable of degrading many of these substrates. Microbial growth on halogenated compounds requires production of catabolic enzymes to cleave the carbon-halogen bonds.

In our investigation, we selected from soil, 12 microorganisms which are able to dehalogenate various aliphatic chloroorganic compounds. Dehalogenation of aliphatic hydrocarbons depends on length of the carbon chain and number of chloride atoms. Moreover, some of the selected bacteria were able to grow on the investigated compounds as sole carbon source. Two dehalogenating systems may coexist in individual bacterial strain. All bacterial isolates which are able to grow on chloroorganic compounds were gram-negative. Dehalogenating enzymes are:

- intracellular,
- induced by growth in the presence of chloroorganic compounds,
- inhibited by addition glucose to the medium.

Recenzent: Prof. dr hab. inż. Korneliusz Miksch