

Ewa KWAPISZ, Małgorzata PATEK, Jacek POLAK, Małgorzata PIOTROWICZ-WASIAK,
Edward GALAS

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

AKTYWNOŚĆ OKSYGENAZ I DEHYDROGENAZ BAKTERII DEGRADUJĄCYCH WĘGLOWODORY OLEJU NAPĘDOWEGO

Streszczenie. Głównymi enzymami włączonymi w proces biodegradacji węglowodorów są oksygenazy i dehydrogenazy. Ich aktywność może być wskaźnikiem aktywności metabolicznej drobnoustrojów w skażonym środowisku. Badania aktywności ww. enzymów przeprowadzone dla dwóch szczepów bakterii aktywnie degradujących węglowodory wskazują na zróżnicowaną wrażliwość obu systemów enzymatycznych w zależności od użytych parametrów natlenienia. Poziom aktywności oksygenaz i dehydrogenaz oraz stopień indukcyjności tych systemów pozostają w dużym stopniu cechą indywidualną szczepu. Pomiar aktywności oksygenaz (aktywności oddechowej) z racji łatwości i szybkości oznaczenia, możliwości przeprowadzenia go *in situ* wydaje się być bardziej odpowiedni do diagnozowania aktywności metabolicznej drobnoustrojów w skażonym środowisku w porównaniu z oznaczeniem aktywności dehydrogenaz.

OXYGENASES AND DEHYDROGENASES ACTIVITY OF BACTERIA DEGRADING FUEL OIL HYDROCARBONS

Summary. Oxygenases and dehydrogenases are the main enzymes responsible for biodegradation of hydrocarbons. Their activity may serve as an indicator of metabolic activity of microorganisms in polluted site. These activities were investigated for two bacterial strains with the high ability to hydrocarbons degradation. Different effect of the aeration conditions on functioning of these enzyme systems was observed in the case of each strain. The assay of oxygenases (respiration) activity is easier and faster than dehydrogenases, therefore is more suitable for assessment of microbial activity in polluted site.

WPROWADZENIE

Efektywność procesu biodegradacji węglowodorów w warunkach tlenowych zależy w dużym stopniu od aktywności enzymów należących do grupy oksygenaz i dehydrogenaz [1,2]. Obecność tych enzymów w komórkach drobnoustrojów uwarunkowana jest przede wszystkim czynnikami genetycznymi, chociaż istotne są również mechanizmy adaptacji i

indukcji, które powodują wzmożenie syntezy enzymów pod wpływem obecnych w środowisku specyficznych substratów. W pierwszym etapie procesu utleniania węglowodorów włączone są oksygenazy, następne etapy przyswajania substratu odbywają się z udziałem dehydrogenaz. Utlenianie alkanów rozpoczyna zazwyczaj kompleks monooksygenaz, prowadząc reakcje terminalnej lub subterminalnej oksydacji. Oksygenazy właściwe-dioksygenazy rozpoczynają proces degradacji benzenu. Pośrednik tych przemian – katechol może być utleniany przez dwa rodzaje oksygenaz 1,2- lub 2,3-dioksygenazę katecholową [2]. Do rozkładu alkenów wymagana jest obecność oksygenaz mieszanych. Oksygenazy mieszane biorą także udział w rozkładzie policyklicznych związków aromatycznych. W proces utleniania alkoholi do aldehydów i kwasów włączone są dehydrogenazy współdziałające z jednym z nukleotydów nikotynamidoadeninowych.

Specjaliści z dziedziny biotechnologii środowiskowej poszukują metod szybkiej oceny aktywności metabolicznej mikroflory rozwijającej się w skażonym środowisku. Takim wskaźnikiem może być poziom aktywności oksygenaz lub dehydrogenaz drobnoustrojów biorących udział w procesie oczyszczania [3].

W ramach pracy podjęto się oznaczenia aktywności ww. systemów enzymatycznych dla dwóch wybranych szczepów bakterii. Ponieważ wiadomo, że czynnikiem silnie determinującym aktywność oksygenaz i dehydrogenaz jest natlenienie, podjęto próby określenia, w jakim stopniu zmienne parametry natlenienia środowiska hodowlanego kształtują poziom aktywności tych enzymów.

MATERIAŁY I METODY

Szczepy bakterii

Materiał biologiczny do badań stanowiły dwa szczepy bakterii, oznaczone symbolami S7 i G3, wyizolowane odpowiednio ze ścieków zakładów petrochemicznych i gleby.

Szczepy przechowywano na podłożu stałym, zawierającym glukozę, ekstrakt drożdżowy, zestaw soli mineralnych. Wartość pH podłoża regulowano przed sterylizacją do wartości 6,5. Powierzchnię podłoża na skosie pokrywano filmem sterylnego oleju napędowego w ilości 0,05 ml/10 cm² powierzchni pożywki. Na podłożu tym przygotowywano również inokulum do prowadzenia hodowli płynnych. Inokulum hodowano w ciągu dwóch dni w temperaturze 30°C.

Warunki hodowli wstrząsanej

Hodowle wstrząsane badanych szczepów prowadzono w podłożu A, stosując jako źródło węgla olej napędowy w stężeniu 6% wagowych. Próby prowadzono w kolbach płaskodennych o pojemności 500 ml wypełnionych podłożem w ilości 40, 60, 80 ml. Stężenie oleju napędowego wynosiło 6%. Szybkość obrotów wytrząsarki 220 obr/min, amplituda 4,5 cm, temperatura hodowli 30°C, czas hodowli - 14 dni.

Zużycie węglowodorów ogółem

Do określenia stopnia zużycia węglowodorów podczas hodowli posługiwano się metodą wagową. Po poddaniu zawiesiny hodowlanej wirowaniu (40 000g, temp. 4°C, czas 20 min)

zbierano warstwę olejową i ważono. Ubytek węglowodorów ogółem obliczano z różnicy między ilością substratu, np. oleju napędowego, dodanego do podłoża przed hodowlą, a ilością węglowodorów znajdujących się w poszczególnych próbach po hodowli. W obliczeniach tych uwzględniano częściowe odparowanie substratu podczas hodowli.

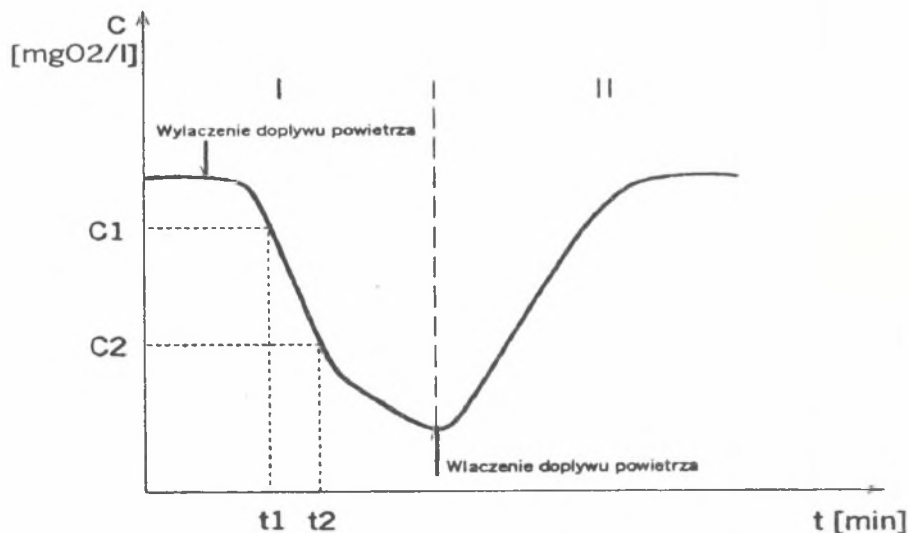
Zawartość węglowodorów aromatycznych

Zawartość węglowodorów aromatycznych w próbach hodowlanych oznaczano metodą spektrofotometryczną wykorzystując zdolność tych związków do tworzenia widm w świetle UV. Analizę prowadzono w oparciu o krzywą kalibracyjną, wykonaną dla fenolu. Pomiarów dokonywano na spektrofotometrze firmy Beckman przy długości fali $\lambda=272$ nm. Jako rozpuszczalnika używano n-heksanu.

Aktywność oddechowa bakterii degradujących węglowodory

Oznaczenie aktywności oddechowej bakterii degradujących węglowodory oleju napędowego prowadzono w oparciu o pomiar szybkości zużywania tlenu rozpuszczonego w cieczy hodowlanej, przy użyciu czujnika tlenowego serii CTN-920, połączonego z mikrokomputerowym tlenomierzem CO-551 firmy ELMETRON. Pomiaru dokonywano podczas krótkiej, kilkudziesięciosekundowej przerwy w napowietrzaniu hodowli. Na rysunku 1 przedstawiony jest typowy przebieg zmian stężenia tlenu w zawiesinie hodowlanej podczas przerwy w napowietrzaniu i po ponownym włączeniu dopływu powietrza.

Podstawą do obliczenia wartości aktywności oddechowej szczepów były dane uzyskane w przedziale czasu t_1-t_2 i odpowiadające im wartości stężenia rozpuszczonego tlenu w zakresie C_1-C_2 .



Rys. 1. Typowy przebieg stężenia rozpuszczonego tlenu w zawiesinie hodowlanej podczas krótkiej przerwy w napowietrzaniu i po ponownym włączeniu dopływu powietrza

Fig. 1. Time course of dissolved oxygen concentration during short break in the aeration of culture

Oznaczanie aktywności dehydrogenaz

Oznaczenia aktywności dehydrogenaz dokonywano prowadząc reakcję enzymatyczną z udziałem NAD. Oznaczenia wykonywano dla surowych ekstraktów komórek pobranych z zawiesiny hodowlanej podczas procesu degradacji. Do przygotowania surowych ekstraktów komórek posłużono się następującą procedurą: do probówek Eppendorfa pobierano z kolb hodowlanych po 1 ml zawiesiny komórek i wirowano przy 7300g w temperaturze pokojowej w czasie 5 min. Po odwirowaniu supernatant zlewano, a pozostałą w probówkach biomasę zawieszano w 1 ml roztworu 15 mM buforu fosforanowego. Zawieszono w buforze komórki biomasy poddawano 10-krotnemu zamrażaniu w łaźni z suchym lodem i stężonym etanolem i rozmrażaniu. Po wykonaniu wstępnych prób ustalono następujący skład mieszaniny reakcyjnej:

bufor fosforanowy	2,6 ml,
olej napędowy	0,1 ml,
NAD	0,1 ml,
ekstrakt komórkowy	0,2 ml.

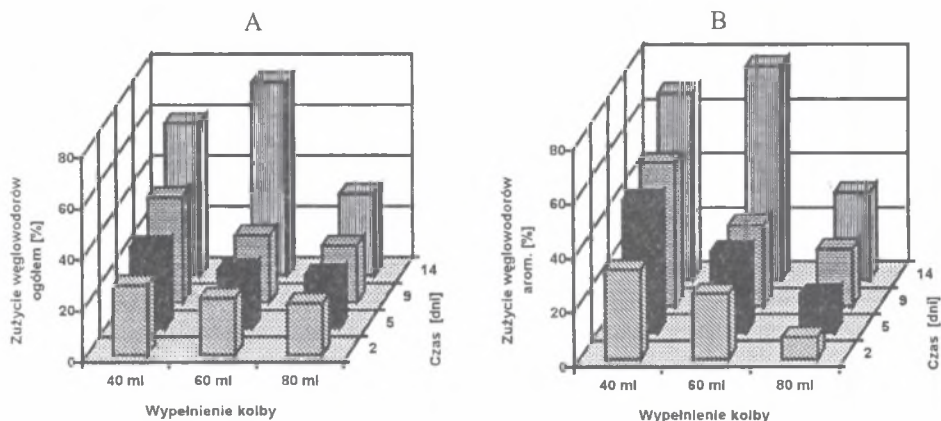
Miarą aktywności dehydrogenaz były wyniki pomiaru absorbancji wykazywanej przez zredukowaną formę dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NADH) powstającą w wyniku reakcji. Pomiary przeprowadzano na spektrofotometrze firmy Beckman przy długości fali $\lambda=340$ nm. Oznaczeń dokonywano w odstępach pięciominutowych. Reakcja przebiegała w naczyniu wyposażonym w mieszadło magnetyczne, czas trwania reakcji, w zależności od próby, 60-180 min.

WYNIKI BADAŃ

Wybrane do badań szczepy G3, i S7 charakteryzują się wysoką zdolnością do biodegradacji węglowodorów. Wyizolowane zostały z różnych środowisk, bytowały w skażonym węglowodorami środowisku w odmiennych warunkach tlenowych. W celu zbadania wpływu natlenienia na szybkość biodegradacji węglowodorów z udziałem badanych szczepów przeprowadzono próby hodowlane stosując różne wypełnienia 500 ml kolb płaskodennych podłożem A zawierającym 6% oleju napędowego. Zastosowano następujące objętości podłoża: 40, 60, 80 ml, co odpowiada oznaczonym metodą siarczynową wartościom OAR (oxygen absorption rate): 0,62; 0,58; 0,55 $\text{mMO}_2/\text{l}\cdot\text{min}$. Obserwacje stopnia zużycia węglowodorów w ciągu 14 dni hodowli z użyciem różnych wypełnień kolb wskazują, że wybrane do badań szczepy wykazują zróżnicowaną tolerancję na zmiany parametrów natlenienia. Szczep G3 wykazuje najwyższą aktywność degradacyjną przy wypełnieniu kolb - 60 ml. Szczep S7, bez względu na zastosowane parametry natlenienia (w badanym zakresie), wykazuje wysoką aktywność degradacyjną objawiającą się zużyciem węglowodorów w ciągu 14 dni hodowli w ilościach 68-80%. Uzyskane wyniki zużycia węglowodorów ogółem i węglowodorów aromatycznych przez szczepy G3 i S7 obrazują odpowiednio rysunki 2 i 3.

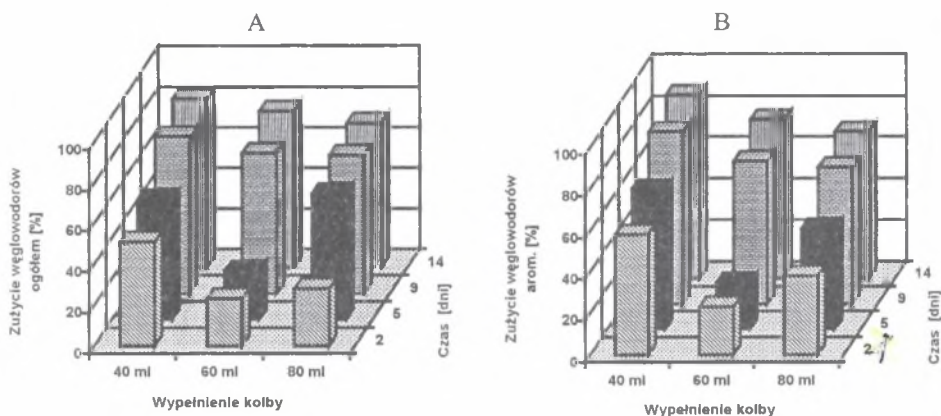
Uwagę zwraca fakt wysokiego zużycia węglowodorów aromatycznych przez szczep S7, niezależnie od zastosowanych warunków natlenienia oraz największego zużycia węglowodorów aromatycznych przez szczep G3 w optimum natlenienia wynoszącym 0,58 $\text{mMO}_2/\text{l}\cdot\text{min}$.

Szczepy G3 i S7 z uwagi na ich zróżnicowane wymagania tlenowe i różną tolerancję na zmiany stężenia tlenu mogą stanowić dobry materiał porównawczy dla określenia roli aktywności oksygenaz i dehydrogenaz w procesie degradacji węglowodorów.



Rys. 2. Wpływ wypełnienia kolby na zużycie węglowodorów ogółem (A) i aromatycznych (B) przez bakterie szczepu G3

Fig. 2. The effect of culture volume on utilization of total (A) and aromatic (B) hydrocarbons by bacteria of G3 strain



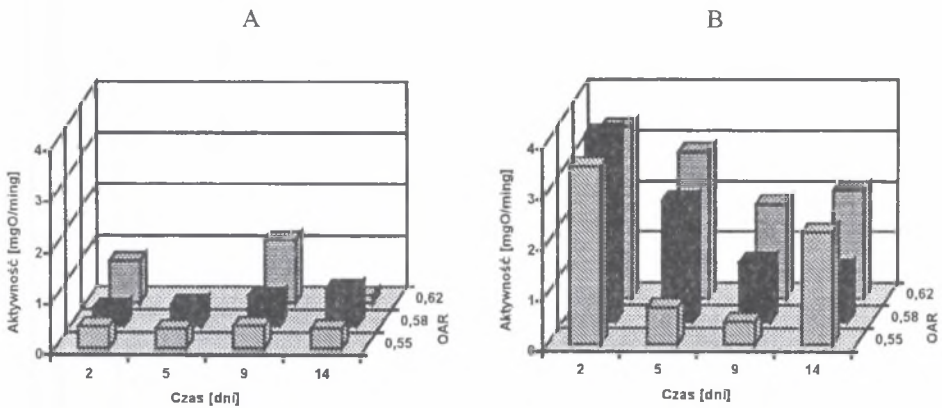
Rys. 3. Wpływ wypełnienia kolby na zużycie węglowodorów ogółem i aromatycznych przez bakterie szczepu S7

Fig. 3. The effect of culture volume on utilization of total (A) and aromatic (B) hydrocarbons by bacteria of S7 strain

Aktywność oksygenaz, pozostającą funkcją aktywności oddechowej, oznaczano dokonując pomiaru szybkości zużycia tlenu rozpuszczonego w środowisku hodowlanym. Wykorzystano do tego celu czujnik tlenowy połączony z mikrokomputerowym tlenomierzem. Pomiar stężenia rozpuszczonego tlenu prowadzono w czasie 30-90-sekundowej przerwy w napowietrzaniu płynu hodowlanego. Charakter krzywej, obrazującej zmiany stężenia rozpuszczonego tlenu podczas krótkiej przerwy w napowietrzaniu i po ponownym włączeniu

dopływu powietrza, przedstawiono w części metodycznej pracy. Podstawą do wykonania obliczenia był fragment krzywej znajdujący się między punktami C_1 i C_2 . Aktywność oksygenaz wyrażano w $\text{mg O}_2/\text{l}\cdot\text{min}\cdot\text{g}$ licząc wartość $\text{tg}\alpha$ nachylenia prostej, czyli stosunek zmian stężenia tlenu ($\Delta C=C_1-C_2$) w cieczy hodowlanej, do czasu ($\Delta t=t_2-t_1$), w którym prowadzono pomiar, w przeliczeniu na minutę i gram białka. Otrzymany wynik określa ilość tlenu cząsteczkowego, wchłoniętego przez drobnoustrój w jednostce czasu, w przeliczeniu na 1 gram białka. Uzyskane wyniki pomiarów prowadzonych dla badanych szczepów obrazuje rysunek 4.

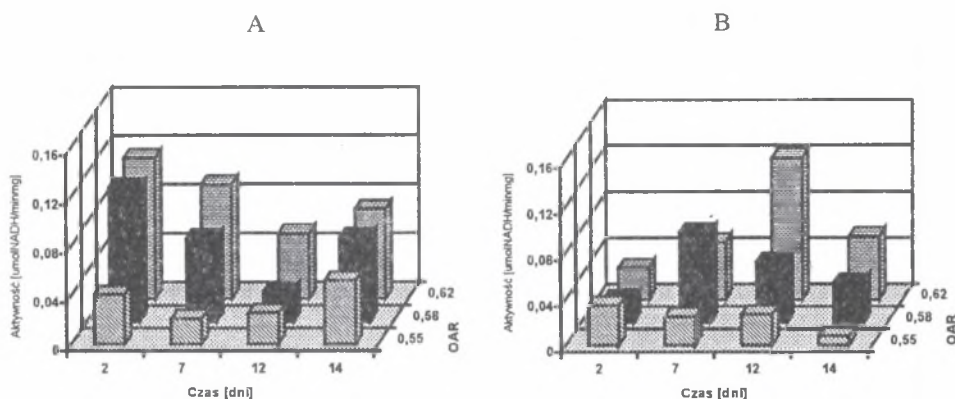
Analizując przedstawione na nim dane, stwierdzić należy, że bez względu na zastosowane parametry natlenienia szczep S7 wykazuje znacznie wyższą aktywność oddechową w porównaniu ze szczepem G3. Zmiany stopnia zużycia węglowodorów przez szczep S7, w zależności od zastosowanych parametrów natlenienia, pozostają w ścisłej korelacji z aktywnością oddechową komórek. Oksygenazy obu szczepów wykazują zbliżoną wrażliwość na zmiany warunków natlenienia w badanym zakresie. Ich aktywność oddechowa w 80 ml utrzymuje się średnio na poziomie 30% w porównaniu z aktywnością obserwowaną podczas hodowli w 40 ml.



Rys. 4. Wpływ aeracji na aktywność właściwą oksygenaz bakterii szczepu G3 (A) i S7 (B)

Fig. 4. The effect of aeration on the specific activity of oxygenases of bacterial strains G3 (A) and S7 (B)

Hodowle prowadzone z zastosowaniem zróżnicowanych warunków natlenienia stanowiły również podstawę do oznaczenia aktywności dehydrogenaz badanych szczepów. Do badań tej aktywności zastosowano metodę bezpośredniej reakcji z udziałem NAD. Skład mieszaniny reakcyjnej podano w części metodycznej pracy. Oznaczenia aktywności dehydrogenaz dokonywano, prowadząc reakcje enzymatyczne z użyciem surowych ekstraktów komórek. W czasie reakcji następowała redukcja utlenionej formy dinukleotydu nikotynamidoadeninowego, na skutek przeniesienia atomów wodoru z substratu (oleju napędowego) na koenzym z udziałem dehydrogenaz. Przebieg reakcji rejestrowano na spektrofotometrze, wykorzystując właściwość utlenionej formy koenzymu do tworzenia widma przy długości fali 340 nm. Wyniki oznaczeń przedstawiono na rysunku 5.



Rys. 5. Wpływ aeracji na aktywność właściwą dehydrogenaz bakterii szczepu G3 (A) i S7 (B)

Fig. 5. The effect of aeration on the specific activity of dehydrogenases of bacterial strains G3 (A) and S7 (B)

Aktywność właściwa dehydrogenaz obu badanych szczepów pozostaje w wyraźnej proporcji do warunków natlenienia. W warunkach najlepszego spośród badanych natlenienia (wypełnienie kolby 40 ml, OAR 0,62) wartości aktywności właściwej dehydrogenaz dla obu szczepów niemal we wszystkich przypadkach są również najwyższe. Uwagę zwraca fakt, że szczep G3 niezależnie od warunków natlenienia wykazuje wyraźnie wyższą aktywność dehydrogenaz w porównaniu ze szczepem S7. Fakt wykazywania przez szczep S7 wyróżniającej się wysoką aktywnością degradacyjną stosunkowo niskiej aktywności dehydrogenaz potwierdza wcześniejsze obserwacje o braku wyraźnej korelacji między aktywnością degradacyjną szczepu i aktywnością dehydrogenaz [4].

Uzyskane wyniki wskazują, że szczep S7 charakteryzuje się wyraźnie wyższą aktywnością oddechową w porównaniu ze szczepem G3. Szczep G3 natomiast wyposażony jest w silny system dehydrogenaz, aktywny w szerokim zakresie natlenienia.

Podsumowując dane uzyskane w ramach doświadczeń mających na celu oznaczenie aktywności oksygenaz i dehydrogenaz szczepów bakterii degradujących węglowodory stwierdzić należy, że poziom aktywności obu enzymów może pozostawać w pewnej korelacji z aktywnością degradacyjną szczepu. Indukcyjność tych systemów w zmiennych warunkach natlenienia może dostarczać cennych wiadomości na temat fizjologii szczepów. Poziom wyjściowy tych aktywności jest jednak przede wszystkim cechą indywidualną drobnoustroju. Która z mierzonych aktywności jest bardziej przydatna dla oceny fizjologii drobnoustrojów w skażonym środowisku pozostaje kwestią do dyskusji. Oznaczenie aktywności oddechowej drobnoustrojów w porównaniu z oznaczeniem aktywności dehydrogenaz jest jednak o wiele prostsze, szybsze i może być wykonane *in situ*. Ten parametr można więc uznać za bardziej odpowiedni do szybkiej oceny możliwości degradacyjnych drobnoustrojów rozwijających się w skażonym środowisku.

LITERATURA

1. Watkinson R. J., Morgan P.: *Physjology of liphatic hydrocarbon-degrading microorganisms* Biodegradation I, 72-92, 1990.
2. Smith M. R.: *The biodegradation of aromatic hydrocarbons bacteria*, Biodegradation I, 191-206, 1990.
3. Miksch K.: *Biochemiczne metody oceny aktywności drobnoustrojów osadu czynnego*, Postępy Mikrobiologii, 22, 189-205, 1983.
4. Galas E., Kwapisz E., Tarabasz-Szymańska Ł., Krystynowicz A., Antczak T., Oryńska A.: *Charakterystyka wybranych szczepów bakterii degradujących węglowodory ropy naftowej*, Biotechnologia, 1(36), 145-157, 1997.

Abstract

Oxygenases and dehydrogenases are the main enzymes responsible for biodegradation of hydrocarbons. Their activity may serve as an indicator of metabolic activity of microorganisms in polluted site. These activities were investigated for two bacterial strains with the high ability to hydrocarbons degradation. The oxygenases (respiration) activity was determined on the basis of changes of dissolved oxygen concentration during short brake in aeration of liquid culture. Dehydrogenases activity was assayed by direct reaction in the mixture consisted of: crude cell extract, fuel oil and NAD. The results of these activities assays indicate that their level is very specific for each strain. Bacteria of S7 strain expressed the high activity of oxygenases and in the case of G3 the high dehydrogenases activity was observed.

Different effect of the aeration conditions on functioning of these enzyme systems was observed in both strains. The assay of oxygenases activity is easier and faster than dehydrogenases, therefore is more suitable for assessment of microbial activity in polluted site.

Recenzent: Prof. dr hab. inż. Korneliusz Miksch