Biodegradacja związków ropopochodnych przez grzyby strzępkowe

Katarzyna Lisowska, Jerzy Długoński

Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii, Uniwersytet Łódzki, Łódź

Biodegradation of oil-derived compounds by filamentous fungi

Summary

The development of industry, especially oil and chemical branches, resulted in the contamination of the natural environment by oil-derived compounds, including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). These compounds are highly toxic to the living organisms, most of them expressing carcinogenic properties. Microbiological degradation is one of the main methods of removing PAHs from the environment. Biodegradation reduces the costs of recultivation by considerable acceleration of the degradation of those compounds in the soil. Microscopic fungi play an important role in the process of PAHs detoxification and degradation. Our studies have shown that a number of strains involved in the steroids transformation are also capable of PAHs degradation. Due to the fact that both processes involve the participation of cytochrome P-450, these strains are convenient research models for explaining the dependence between steroid hydroxylases and enzymes responsible for PAHs degradation. The currently performed research is aimed at developing the possibilities of employing microorganisms used for the production of steroid drugs in the protection of the environment.

Key words:
fungi, biodegradation, PAH, cytochrome P-450.

Adres do korespondencji

Katarzyna Lisowska,
Katedra Mikrobiologii
Przemysłowej
i Biotechnologii,
Uniwersytet Łódzki,
ul. Banacha 12/16,
90-237 Łódź.

biotechnologia
4 (63) 92–100 2003

1. Wprowadzenie

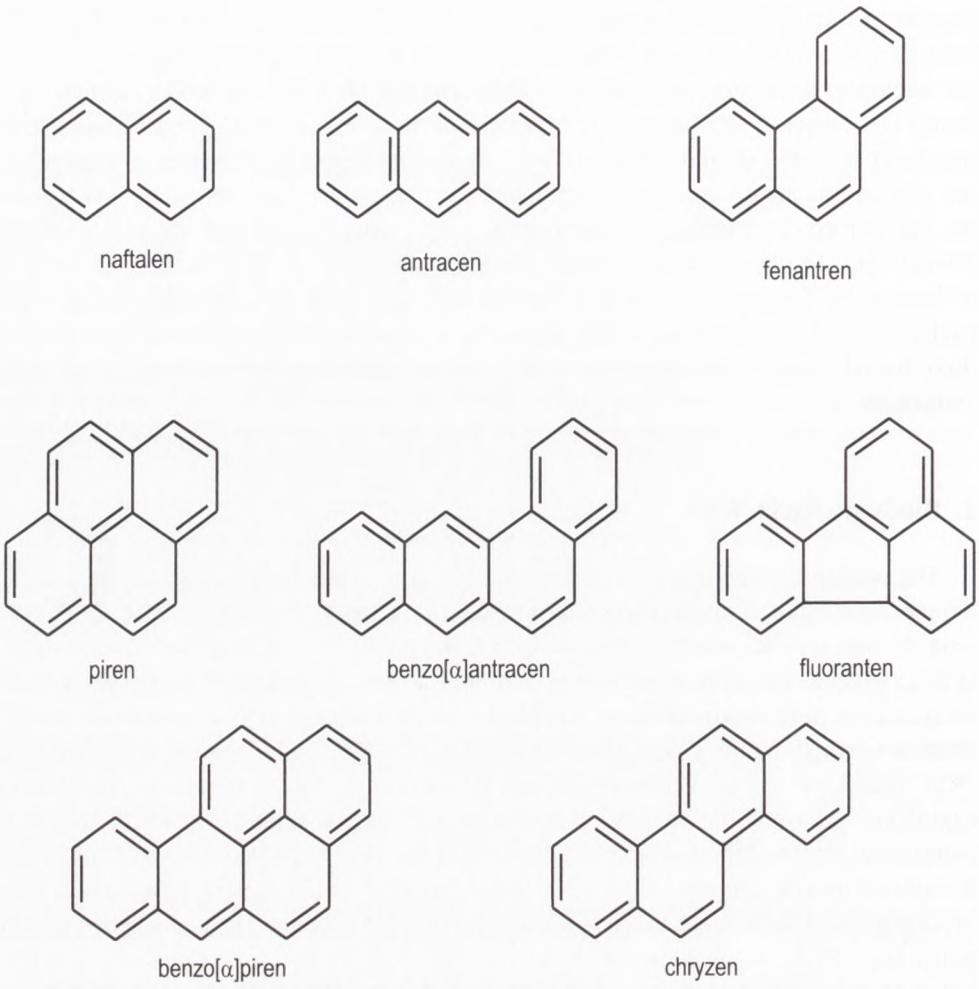
Do środowiska naturalnego dostaje się szereg zanieczyszczeń antropogennego pochodzenia, niosących ze sobą wiele szkodliwych związków chemicznych, a wśród nich liczne kseno-

biotyki, do których zaliczane są związki ropopochodne. Na czele listy najbardziej toksycznych związków, pochodzących głównie z przeróbki ropy naftowej, znajdują się wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) oraz wiele pochodnych fenoli (1). Fenole i ich halogenowe pochodne powstają głównie w procesach termicznej przeróbki węgla: koksowania i upłynniania węgla oraz w trakcie oczyszczania półproduktów tych procesów (2) i występują łącznie z innymi zanieczyszczeniami, do których należą m.in. cyjanki, organiczne i nieorganiczne związki azotu, WWA. Związki te są substancjami trudno rozkładalnymi, część z nich może egzystować w środowisku przez wiele lat (3). Ksenobiotyki stają się coraz bardziej oporne na rozkład, a jednocześnie rosną ich mutagenne i toksyczne właściwości, dlatego tak duży nacisk kładzie się na opracowanie metod mikrobiologicznej degradacji tych związków.

2. Biodegradacja WWA

Do wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych należą związki składające się z kilku skondensowanych pierścieni aromatycznych (rys. 1). Charakteryzują się one wysoką masą cząsteczkową i niską polarnością. Trwałość i toksyczność WWA zwiększa się wraz ze wzrostem ich masy cząsteczkowej (liczby pierścieni aromatycznych, podstawników), co zwiększa ich hydrofobowość, a w konsekwencji ułatwia rozpuszczanie w tłuszczach i akumulację w tkankach organizmów wyższych (4,5). Niska polarność WWA utrudnia ich wydalanie z organizmu, zaś ich przekształcanie w wątrobie ssaków może prowadzić do tworzenia silnie toksycznych związków, np. bardzo reaktywnych form epoksydowych. Epoksydy mogą łączyć się z nukleofilowymi grupami DNA i białek przez co są zaliczane do grupy związków mutagennych i kancerogennych (6). WWA występują głównie jako produkt spalania paliw kopalnych, zarówno w elektrociepłowniach, jak i podczas transportu. Dodatkowo te toksyczne i trudno rozkładalne związki dostają się do środowiska z przemysłu petrochemicznego, ścieków, z procesów zabezpieczania drewna kreozotem oraz w czasie wycieków w rafineriach i podczas transportu ropy naftowej i olejów. Ze źródeł naturalnych WWA dostają się do środowiska bardzo rzadko, np. w wyniku naturalnych wycieków ropy naftowej lub wybuchu wulkanów, jednakże często są to bardzo silne skażenia (1).

Węglowodory aromatyczne jako związki hydrofobowe łatwo adsorbują się na materii organicznej w glebie i w wodzie, gdzie ich stężenie zależy głównie od odległości od rejonów przemysłowych, cyrkulacji powietrza i wody (1). Ksenobiotyki te mogą występować w różnym stanie rozproszenia, np. jako cienkie warstwy homogennych cieczy lub jako emulsje. Jednocześnie szybko łączą się z osadami dennymi lub glebą i utrzymują się tam bez utraty toksycznych właściwości lub są bioakumulowane w łańcuchu pokarmowym (1,7).



Rys. 1. Budowa chemiczna wybranych WWA

WWA mogą ulegać przekształceniu lub rozkładowi na drodze abiotycznej, np. poprzez parowanie, fotoutlenienie, utlenienie chemiczne, sedymentację. Jednakże główną rolę w degradacji tych związków odgrywają drobnoustroje (1). Węglowodory aromatyczne mogą być całkowicie rozkładane (mineralizowane) lub jedynie częściowo przekształcane przez pojedyncze drobnoustroje lub różne grupy mikroorganizmów na zasadzie kometabolizmu. Obecnie znanych jest wiele drobnoustrojów zdolnych do degradacji niskocząsteczkowych związków aromatycznych, natomiast mniej jest danych o biotransformacji wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, o dużej masie cząsteczkowej. Organizmy zdolne do przekształcania WWA należą do różnych rodzajów bakterii, drożdży, grzybów strzępkowych i alg (zesta-

wienie). Mikrobiologiczny rozkład WWA jest zatem alternatywnym w stosunku do tradycyjnych metod, sposobem bioremediacji skażonych węglowodorami gleb i detoksykacji tych niebezpiecznych związków.

Zestawienie

Wybrane organizmy przekształcające WWA

GRZYBY
Aspergillus niger
Cunninghamella elegans
Cunninghamella japonica
Penicillium chrysogenum
Rhizopus oryzae
Saccharomyces cerevisiae
BAKTERIE
Bacillus cereus
Mycobactreium sp.
Pseudomonas sp.
Rhodococcus sp.
GLONY
Oscillatoria sp.
Nostoc sp.
Anabena sp.

Rozkład WWA przez bakterie zapoczątkowany jest przez ich utlenienie, polegające na włączeniu przy udziale dioksygenaz, obu atomów tlenu cząsteczkowego do pierścienia, co osłabia jego stabilność i ułatwia rozerwanie wiązań i dalszy rozkład, w wyniku którego powstają *cis*-dwuhydrodiole ulegające stereoselektywnej dehydrogenacji do formy dwuhydroksylowej, katecholu. Katechol będący podstawowym metabolitem pośrednim ulega rozszczepieniu w pozycji *orto* lub *meta*. W wyniku kolejnych reakcji powstają proste metabolity włączane do cyklu Krebsa (1,8,9).

W przeciwieństwie do bakterii, grzyby metabolizują WWA w reakcjach, które są podobne do procesów przeprowadzanych przez układy enzymatyczne ssaków. Katalizatorem początkowej epoksydacji jest monooksygenaza zawierająca cytochrom P-450, wprowadzająca do pierścienia tylko jeden atom tlenu, zaś drugi redukowany jest do cząsteczki wody. Powstały w tej reakcji tlenek arenu (epoksyd) jest związkiem nietrwałym, ale silnie toksycznym. Może on w reakcji nieenzymatycznej ulec przekształceniu do fenoli, te zaś są sprzęgane w koniugaty z kwasem siarkowym, kwasem glukuronowym lub glukozą (1). Koniugaty są lepiej rozpuszczalne w wodzie, a co za tym idzie sprawniej wydalane z organizmu i szybciej eliminowane ze środowiska (10,11). Epoksyd może być także przekształcany na drodze enzymatycz-

nej przez hydroksylazę epoksydową do *trans*-dwuhydrodiolu, zaś ten przy udziale $NADP^+$ – zależnej dehydrogenazy zostaje przekształcony do katecholu metabolizowanego na drodze *orto* lub *meta* do związków włączanych w cykl Krebsa. WWA mogą być hydroksylowane w różnych miejscach pierścieni, dlatego w wyniku ich degradacji powstają różnorodne izomery związków (11).

Grzyby lignolityczne, np. *Phanerochaete chrysosporium, Pleurotus ostreatus*, wytwarzają zewnątrzkomórkowe enzymy, peroksydazę ligninową, peroksydazę manganową i lakazę umożliwiające rozkład lignin zawartych w ścianie komórkowej roślin. Peroksydaza ligninowa katalizuje także utlenianie różnorodnych ksenobiotyków o potencjale elektrycznym niższym niż 7,55 eV, np. antracen, piren, benzo[α]antracen. Enzym ten jonizuje aromatyczne związki do powstawania niestabilnego, arylowego kationo-rodnika, który w wyniku dalszego utleniania jest przekształcany do chinonów (8,12-14). Pierścień chinonów jest rozbijany i następuje całkowita mineralizacja związku. Jednakże WWA o potencjale elektrycznym wyższym niż 7,55 eV (fenantren, benzo[α]piren) nie są utleniane przez ten enzym. Peroksydaza manganowa katalizuje reakcję utleniania Mn^{2+} do Mn^{3+}, enzym ten bierze także udział w peroksydacji nienasyconych lipidów i w tych warunkach może katalizować reakcje koutleniania WWA, np. fenantrenu. Lakaza utlenia także związki o niskim potencjale elektrycznym, np. fenole, podobnie jak peroksydaza ligninowa (15).

3. Rola cytochromu P-450 w procesach biodegradacji

W degradacji WWA prowadzonej przez grzyby strzępkowe uczestniczy kompleks enzymatyczny monooksygenazy zawierający hemoproteid – cytochrom P-450. Został on po raz pierwszy wyizolowany z frakcji mikrosomalnej wątroby szczura i opisany przez Omura i Sato (16). Swoją nazwę zawdzięcza intensywnemu pochłanianiu przy 450 nm w CO-widmie różnicowym. Monooksygenazy wymagają do reakcji tlenu cząsteczkowego i NADPH. Elektrony są przenoszone z NADPH przez łańcuch transportu elektronów na utlenioną formę cytochromu P-450, powodując jego redukcję z formy żelazowej Fe^{3+} do żelazawej Fe^{2+}. Po związaniu tlenu cząsteczkowego do hemu następuje przyjęcie drugiego elektronu. Następnie jeden z atomów związanego tlenu ulega redukcji do cząsteczki wody. W dalszej kolejności dochodzi do usunięcia atomów wodoru z substratu i utworzeniu rodnika. Powstały przejściowy wolny rodnik przyłącza pozostały atom związanego tlenu, tworząc produkt reakcji zawierający grupę hydroksylową. Wprowadzenie grupy hydroksylowej do substratu zwiększa jego rozpuszczalność w wodzie, przez co ułatwia wydalanie, a także zmniejsza jego toksyczność (17-19). Umożliwia to również sprzęganie ze związkami o dużej polarności (np. z glukuronidami, siarczanami), co znacznie zwiększa rozpuszczalność tak zmodyfikowanej cząsteczki aromatycznej.

Cytochrom P-450 jest powszechnym składnikiem enzymów oksydo-redukcyjnych, występujących zarówno u mikroorganizmów, jak i u organizmów wyższych (6,20).

W komórkach *Eucaryota* występują różne izoformy cytochromu połączone z błoną retikulum cytoplazmatycznego, które są odpowiedzialne za procesy utleniania różnych substratów lipofilowych w zależności od układu enzymatycznego, w skład którego wchodzą. Cytochrom P-450 jest zaangażowany w metabolizm zarówno alifatycznych, alicyklicznych, jak i aromatycznych związków w reakcjach epoksydacji, hydroksylacji, dealkilacji, N-hydroksylacji, sulfoksydacji, desulfuracji i reduktywnej dehalogenacji (21). Na podstawie podobieństwa sekwencji aminokwasowych zidentyfikowano obecnie ponad 270 rodzin cytochromu P-450, które podzielono na podrodziny (21,22). W ostatnich latach opisano udział cytochromu P-450 w wielu procesach biokonwersji przeprowadzanych przez grzyby (23). Zatem głębsze wyjaśnienie procesów utleniania WWA przez układy enzymatyczne zawierające cytochrom P-450 może mieć znaczące zastosowanie w wielu dziedzinach (20). Cytochrom P-450 jest odpowiedzialny m.in. za wprowadzenie tlenu do cząsteczki substratu steroidowego w procesie 11α i 11β-hydroksylacji korteksolonu i innych kortykosteroidów, wykorzystywanych do produkcji hydrokortyzonu i związków pochodnych stosowanych jako leki przeciwzapalne, przeciwreumatoidalne, przeciwalergiczne (24). Lisowska i Długoński (25) opisali wysoką aktywność degradacyjną w stosunku do WWA szczepów grzybów strzępkowych wykorzystywanych w biotransformacji steroidów. Najbardziej efektywnym drobnoustrojem biorącym udział w tych procesach jest grzyb strzępkowy, należący do klasy *Zygomycetes*, *Cunninghamella elegans* IM 1785/21 Gp wykazujący zdolność do przekształcania WWA w sposób podobny do tego, który ma miejsce w komórkach ssaków. Dlatego też wykorzystuje się ten drobnoustrój jako model badawczy w procesach detoksykacji ksenobiotyków w komórkach *Eucaryota*, w tym człowieka (26,27). W ten sposób określa się jakim zmianom poddawane są pochodzące z zanieczyszczeń węglowodory aromatyczne oraz niektóre leki i środki konserwujące, co jest niezmiernie ważne w przemyśle farmaceutycznym i spożywczym (26-28). W badaniach zmierza się także w kierunku wykorzystania drobnoustrojów wykorzystywanych do produkcji leków steroidowych w procesach bioremediacji (29).

4. Mikrobiologiczny rozkład fenantrenu jako model w badaniach degradacji WWA

Dogodnym związkiem modelowym wykorzystywanym do badania degradacji WWA, zarówno przez grzyby strzępkowe (11,13,15,25,30), bakterie (31-33), jak i komórki ssaków (34) jest fenantren. Nie jest to związek kancerogenny, jednakże organizacja pierścieni aromatycznych jest identyczna jak w związkach bardziej mutagennych i kancerogennych takich jak np. benzo[α]piren (3). Fenantren należy do WWA o najmniejszej masie cząsteczkowej, który posiada region „bay" i „K". Wówczas gdy rozkład przeprowadzany jest przez grzyby, atak enzymatyczny ma miejsce głównie w regionie „bay", jednakże u niektórych z nich np. *Aspergillus niger*,

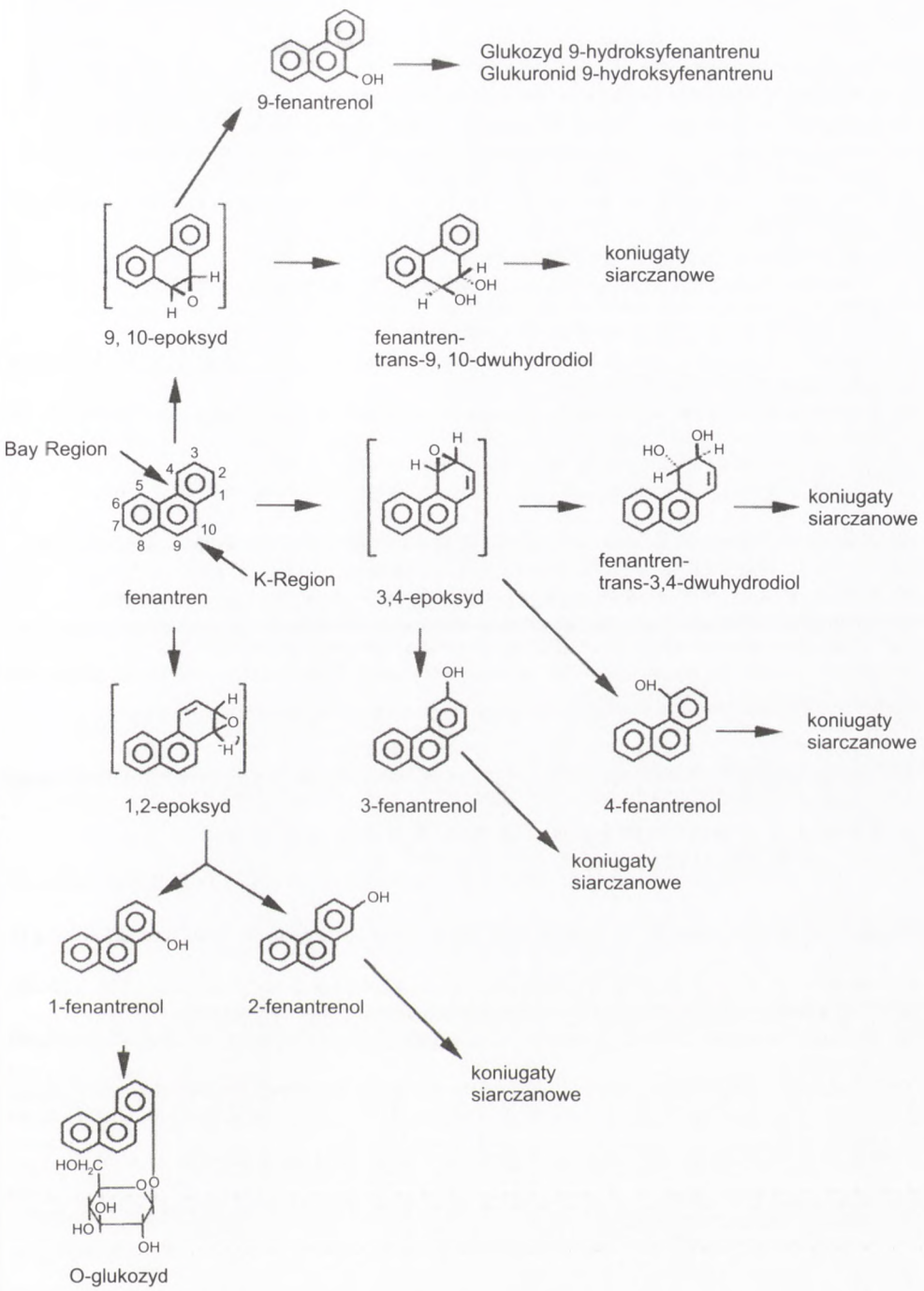
Cuninghamella elegans, Syncephalastrum racemosum opisano zdolność do utleniania tego związku w regionie „K". Region ten jest również głównym miejscem transformacji węglowodorów aromatycznych u ssaków (11). Fenantren, pomimo że nie jest związkiem kancerogennym znany jest jako sensybilizator skóry człowieka, słaby alergen, a także mutagen bakteryjny (35). Jest także słabym induktorem wymiany siostrzanych chromatyd i potencjalnym inhibitorem transportu komórkowego (36).

W badaniach Lisowskiej i Długońskiego (25) opisano szczepy *Cunninghamella elegans* 1785 i 1785/21Gp, zdolne do przekształcania fenantrenu w bardzo wysokich stężeniach (250 mg/l) w porównaniu do szczepów i gatunków prezentowanych w innych pracach. Sutherland i wsp. (6) opisali rozkład fenantrenu (10 mg/l) przez *Streptomyces flavovirens*, a Casillas i wsp. (11) stwierdzili, że szczep *C. elegans* ATCC 9245 degraduje fenantren w stężeniu 50 mg/l.

Fenantren jest całkowicie mineralizowany tylko przez nieliczne mikroorganizmy. Większość grzybów strzępkowych nie rozkłada całkowicie substratów poliaromatycznych, a jedynie przekształca je w związki pochodne. Cerniglia i wsp. (8) zaproponowali szlaki degradacyjne fenantrenu prowadzące do powstania tlenku arenu, który pod wpływem hydroksylazy epoksydowej daje *trans*-dwuhydrodiole. Głównym izomerem powstałym w wyniku tej reakcji jest 1,2-dwuhydrodiol obok *trans*-3,4-dwuhydrodiolu i *trans*-9,10-dwuhydrodiolu. Podobnie jest w przypadku otrzymywanych z epoksydu na drodze nieenzymatycznej fenantrenoli. Istnieje pięć możliwych izomerów fenantrenolu: 1-, 2-, 3-, 4-, 9-fenantrenol, wśród których najczęściej powstaje 1- lub 2-fenantrenol. Najistotniejszym etapem w metabolizmie fenantrenu jest tworzenie koniugatów. Zarówno fenantrenole, jak i *trans*-dwuhydrodiole są sprzęgane w koniugaty m.in. z glukozą, kwasem glukuronowym, siarczanami (rys. 2). Najczęściej spotykane są koniugaty glukozy z 1-hydroksyfenantrenem (9,11,37,38). Lisowska i Długoński (dane nie publikowane) stwierdzili także powstawanie fenantrenoli i koniugatów cukrowych w przekształcaniu fenantrenu przez *C. elegans* IM 1785/21Gp.

4. Podsumowanie

Badania naukowe dotyczące biotechnologii środowiska skupiają się głównie na poszukiwaniu możliwości usunięcia ksenobiotyków ze środowiska naturalnego. Degradacja mikrobiologiczna jest jednym z głównych sposobów eliminacji związków ropopochodnych ze środowiska. W wielu pracach dotyczących degradacji WWA akcentuje się szczególne uzdolnienia grzybów w tym zakresie. Grzyby strzępkowe zdolne są do utleniania potencjalnie rakotwórczych WWA do metabolitów będących produktami detoksykacji. Izolacja drobnoustrojów zdolnych do szybkiej degradacji ksenobiotyków w dużych stężeniach, stwarza możliwość przyspieszenia procesu bioremediacji gleb i znacznego obniżenia jego kosztów.



Rys. 2. Proponowane drogi rozkładu fenantrenu przez *C. elegans* ATCC 9245 i *A. niger* ATCC 6275 wg Casillas i wsp. (11).

Literatura

1. Cerniglia C. E., (1992), Biodegradation, 3, 351-368.
2. Łabużek S., (1991), Biotechnologia, 3-4, 90-101.
3. Samanta S. K, Singh O. V., Jain R. K., (2002), Trends in Biotechnology, 20, 243-248.
4. Meanes J. C., Ward S. G., Hasset J. J., Banwart W. L., (1990), Environ. Sci. Technol., 14, 1524-1528.
5. Hites R. A., LaFlamme R. E., Farrington J. W., (1997), Science, 198, 829-831.
6. Sutherland J. B., Freeman J. P., Selby L. A., Fu P. P., Miller W. D., Cerniglia C. E., (1990), Arch. Microbiol., 154, 260-266.
7. Witt G., Trost E., (1999), Chemosphere, 38, 1603-1614.
8. Cerniglia C. E., Sutherland J. B., Crow S. A., (1992), *Microbial degradation of natural products*, Ed. Winkelmann G., VCH Press, Weinheim, 7, 194-217.
9. Sutherland J. B., (1992), J. Ind. Microbiol., 9, 53-62.
10. Ouyang J., (1999), *Phenanthrene (fungal 9R, 10R) Pathway Map*. University of Minnesota. **http://umbbd.ahc.umn.edu/pha3/pha3_map.html**.
11. Casillas R. P., Crow S. A., Heinze T. M., Deck J., Cerniglia C. E., (1996), J. Ind. Microbiol., 16, 205-215.
12. Aust S. D., (1990), Appl. Environ. Microbiol., 55, 154-158.
13. Bezalel L., Hadar Y., Cerniglia C. E., (1997), Appl. Environ. Microbiol., 63, 2495-2501.
14. Johannes C., Majcherczyk A., (2000), Appl. Environ. Microbiol., 66, 524-528.
15. Boehmer S., Messner K., Srebotnik E., (1998), Biochem. Biophys. Res. Comm., 244, 233-238.
16. Omura T., Sato R., (1964), J. Biol. Chem., 239, 2370-2378.
17. Bossche H. Koymans L., (1998), Mycoses, 1, 32-38.
18. Omura T., (1999), Biochem. Biophys. Res. Comm., 266, 690-698.
19. Stryer L., (1999), *Biochemia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
20. Harford-Cross C. F., Carmichael A. B., Allan F. K., England P. A., Rouch D. A., Wong L-L., (2000), Protein Engineering, 13, 121-128.
21. Yadav J. S., Soellner M. B., Loper J. C., Mishra K. P., (2003), Fungal Gen. Biol., 38, 10-21.
22. Nebert D. W., Russel D. W., (2002), Lancet, 360, 1155-1162.
23. van den Brink H. J. M., van Gorcom R. F. M., van den Hondel C. A. M. J. J., Punt P. J., (1998), Fungal Genetics and Biology, 23, 1-17.
24. Długoński J., (1994), Post. Mikrobiol., 23, 147-159.
25. Lisowska K., Długoński J., (1999), J. Basic Microbiol., 3, 117-125.
26. Pothuluri J. V., Evans F. E., Heinze T. M., Fu P. P., Cerniglia C. E., (1996), J. Toxicol. Env. Health, 47, 587-599.
27. Sutherland J. B., Freeman J. P., Heinze T. M., Moody J. D., Parshikov I. A., Williams A. J., Zhang D., (2001), Xenobiotica, 31, 799-809.
28. Zhang D., Yang Y., Leakey J. E. A., Cerniglia C. E., (1996), FEMS Microbiol. Lett., 138, 221-226.
29. Lisowska K., Długoński J., (2003), J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 85, 63-69.
30. Bezalel L., Hadar Y., Fu P. P., Freeman J. P., Cerniglia C. E., (1996), Appl. Environ. Microbiol., 62, 2547-2553.
31. Fijałkowska S., Lisowska K., Długoński J., (1998), J. Basic Microbiol., 38, 361-369.
32. Moody J. D., Freeman J. P., Doerge D. R., Cerniglia C. E., (2001), Appl. Environ. Microbiol., 67, 1476-1483.
33. Tian L., Ma P., Zhong J-J., (2002), Process Biochemistry, 37, 1431-1437.
34. Jacob J., Raab G., Soballa V., Schmalix W. A., Grimmer G., Greim H., Doehmer J., Seidel A., (1996), Environ. Toxicol.Pharmacol., 1, 1-11.
35. Mastrangela G., (1997), Environ. Health Perspect., 104, 1166-1170.
36. Weis L. M., (1998), Environ. Health Perspect., 106, 17-22.
37. Cerniglia C. E., Campbell W. E., Freeman J. P., Evans F. P., (1989), Appl. Environ. Microbol., 55, 2275-2279.
38. Cerniglia C. E., (1997), J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 19, 324-333.