



## Biodegradacje związków N-heterocyklicznych

Małgorzata Brzezińska-Rodak

Wanda Peczyńska-Czoch

Instytut Chemii Organicznej, Biochemii i Biotechnologii  
Politechnika Wroclawska, Wrocław

### Biodegradation of N-heterocyclic compound

#### Summary

N-heterocyclic aromatic compounds are common contaminants associated with the use of hydrocarbons in both coal gasification and wood treatment processes. Those compounds have been found in groundwater, and many are known mutagens. It is obvious that in many cases the removal of those toxic compounds from our environment is a very complicated and expensive process. A method looking very promising is the one which employs the strains of chosen microorganisms and their biochemical pathways for biodegradation of a number of very dangerous compounds like pyridine, quinoline, carbazole and derivatives of these compounds. Pyridine could be degraded through the same pathway under both aerobic and anaerobic conditions. The first step in this process is hydration. The mechanism of pyridine degradation involves N-C-2 (*Nocardia* Z1) or C-2-C-3 (*Bacillus* 4) ring cleavage. The metabolism of pyridine derivatives and other N-heterocyclic compounds like quinoline, carbazole or indole seems to be initiated by hydroxylation. The initial step in the transformation and a ring cleavage of quinoline derivatives can occur on either the heterocyclic or the homocyclic ring.

In this article we reviewed the current status of this very difficult topic related to microbial degradation of N-heterocyclic compound.

#### Key words:

hazardous waste, N-heterocyclic compounds, microorganisms, biodegradation.

#### Adres do korespondencji

Małgorzata  
Brzezińska-Rodak,  
Instytut Chemii  
Organicznej, Biochemii  
i Biotechnologii,  
Politechnika Wroclawska,  
Wybrzeże  
Wyspiańskiego 27,  
50-370 Wrocław;  
e-mail:  
Rodak@kchf.ch.pwr.wroc.pl

**biotechnologia**

1 (48) 102–116 2000

### 1. Wstęp

W dobie gwałtownego rozwoju przemysłu, stale wzrasta liczba substancji chemicznych trafiających do środowiska. Nasz ekosystem zasilają ksenobiotyki (substancje egzogenne), zarówno celowo wprowadzane (pestycydy) jak i przypadkowo uwalniane odpady przemysłowe pochodzące z wielu gałęzi przemysłu (chemiczny, farmaceu-

tyczny, tekstylny i wiele innych). Często związki trafiające do naszego otoczenia wykazują działanie szkodliwe, czy wręcz stanowią zagrożenie dla życia (1). Na szczególną uwagę zasługują związki N-heterocykliczne. Związki te ulegając rozkładowi uwalniają pewną ilość tlenków azotu, które m.in. przyczyniają się do powstawania tzw. kwaśnych deszczy (2) niszczących ekosystemy.

Z uwagi na wysoką toksyczność związków N-heterocyklicznych, należałoby ograniczyć ich zużycie w różnych gałęziach przemysłu. Wiedząc jednak, że nie zawsze jest to możliwe konieczne jest zwrócenie szczególnej uwagi na procesy usuwania tych związków ze środowiska. Metody niszczenia związków N-heterocyklicznych stosowane dotychczas wymagają wysokiego ciśnienia i temperatury, co znacznie podwyższa koszty tych operacji. Stąd często zaniedbuje się prawidłowego gospodarowania, wciąż narastającymi w środowisku, odpadami chemicznymi. Dlatego tak ważne są poszukiwania alternatywnych sposobów usuwania ich ze środowiska. Zastosowanie mikroorganizmów w tych procesach, jak się wydaje, przedstawia wiele korzyści. Różnorodność drobnoustrojów jest tak wielka, że praktycznie dla każdego typu związków jesteśmy w stanie dobrać mikroorganizm zdolny przekształcać te substancje. Możliwe jest też, na drodze inżynierii genetycznej, takie zmodyfikowanie danego szczepu aby przejawiał on interesujące nas cechy. Dodatkową korzyścią są niskie koszty utrzymania populacji drobnoustrojów i stosunkowo proste, ewentualne, procesy technologiczne.

## 2. Biologiczne predyspozycje gleby do biodegradacji ksenobiotyków

Większość przemian, jakim ulegają ksenobiotyki to przemiany biotyczne (tzn. z udziałem systemów biologicznych). Wiele z tych substancji wykazuje podobieństwo do naturalnie występujących związków i ich degradacja zależy od zdolności systemów enzymatycznych drobnoustrojów do przekształcania tych związków oraz stopnia indukcji przez ksenobiotyki syntezy enzymów potrzebnych do degradacji (1).

Podatność ksenobiotyków na biodegradację zależy od dostępności tych związków dla drobnoustrojów oraz od liczebności i aktywności populacji mikroorganizmów. Dostępność substancji egzogennych do systemów biologicznych zależy od struktury związku, jego rozpuszczalności w wodzie i od stopnia wiązania z glebą. Obecność grup reaktywnych, np. -COOH, -OH czy -NH<sub>2</sub> może ułatwiać atak drobnoustrojów, ale niektóre ugrupowania, takie jak halogenowe czy alkilowe czynią cząsteczkę bardziej odporną na degradację (3).

Biologiczne predyspozycje gleby do biodegradacji zależą oczywiście od żyjących w niej drobnoustrojów, ich rodzaju, liczności populacji. Najliczniejszą grupę stanowią bakterie. W glebie występują m.in. bakterie z rodzajów: *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Caulobacter*, *Cellulomonas*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* i *Xanthomonas* (1,4). Najliczniejszą grupę drobnoustrojów wyizolowanych z gleby, zanieczyszczonych wód czy osadów, stanowią należące do rodzaju *Pseudomonas* (4). W glebie występują również grzyby; najbardziej powszechne to: *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Penicillium* i *Trichoderma* (1). Wreszcie, w glebie występują enzymy w stanie wolnym. Są to albo zewnątrzkomórkowe enzy-



my w naturalny sposób uwalniane przez drobnoustroje albo dostające się tam po lizie komórek (1).

W wyniku działalności mikroorganizmów ksenobiotyki ulegają reakcjom: dehalogenacji, deaminacji, dekarboksylacji, hydroksylacji,  $\beta$ -oksydacji, redukcji wiązań podwójnych i potrójnych, utlenieniu grup zawierających siarkę, hydratacji podwójnych wiązań, polimeryzacji (5).

Zanieczyszczenie środowiska związkami N-heterocyklicznymi stanowi poważny problem z uwagi na ich większą rozpuszczalność w wodzie w odniesieniu do homocyklicznych analogów. Występują w glebie, wodach gruntowych, osadach (rzecznych, ściekowych). Można je znaleźć także w tkankach ryb żyjących w zanieczyszczonych wodach (6).

Praca ma na celu pokazanie przemian jakim ulegają w środowisku, z udziałem drobnoustrojów, związki N-heterocykliczne takie jak: pirydyna, chinolina, akrydyna, indol, karbazol oraz pochodne tych związków.

### 3. Degradacje odpadów przemysłowych przez drobnoustroje glebowe

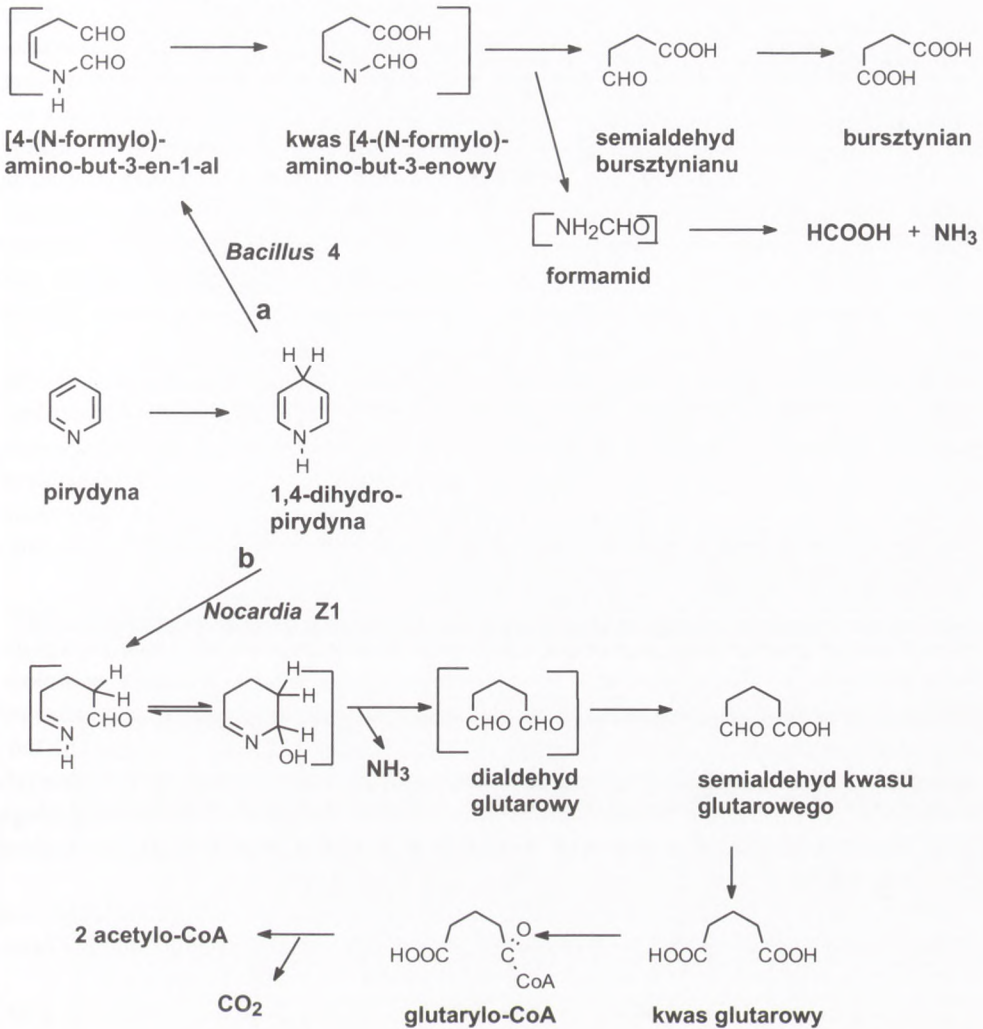
#### 3.1. Mikrobiologiczne przekształcenia pirydyny i pochodnych

Pochodne pirydyny znalazły zastosowanie w przemyśle, rolnictwie i medycynie. Pirydyna używana jest jako rozpuszczalnik w niektórych reakcjach chemicznych oraz przy ekstrakcji węgla kamiennego. Jej pochodne odgrywają ważną rolę biologiczną (NAD, witamina B<sub>6</sub>). Pochodne pirydyny mają działanie bakteriobójcze i grzybobójcze. Stosowane są jako leki rozkurczowe, przeciwgruźlicze, antydepresyjne (7).

Zanieczyszczenie środowiska pirydyną jest wynikiem przetwarzania oleju silnikowego i używania pestycydów. Dobra znajomość przemian, jakim ulega ten związek, jest konieczna z uwagi na jej wysoką toksyczność i teratogenność (8). Pirydyna jest rozpuszczalna w wodzie i stanowi głównie zanieczyszczenie beztlenowych, podpowierzchniowych osadów. Mimo przeprowadzonych badań, mechanizm przemian nie jest do końca wyjaśniony (9). Okazuje się, że degradacja pirydyny przebiega tak samo w warunkach tlenowych jak i beztlenowych (8). Transformacje pirydyny przebiegają według alternatywnych, redukcyjnych szlaków. Jeden z tych szlaków przebiega z udziałem szczepu *Bacillus* 4 (9,10). Podobnie, pirydyna jest transformowana przez *Corynebacterium* i *Brevibacterium*. Przeprowadzone badania (z oznakowaną (2<sup>14</sup>-C)pirydyną) dowodzą, że otwarcie pierścienia pirydyny następuje między drugim a trzecim atomem węgla. Jednakże nie bardzo znane są etapy pośrednie w tej reakcji (schemat 1-ścieżka a) (11).

Nieco inną drogą przebiega transformacja pirydyny przy udziale szczepu *Nocardia* Z1. Zidentyfikowano pięciowęglowe produkty pośrednie, co świadczyć może o pęknięciu pierścienia pirydyny między atomem azotu a węglem w pozycji 2. Również w tym szlaku pierwszym etapem jest uwodornienie. Dalsze reakcje przebiegają jednak według innego mechanizmu otwarcia pierścienia pirydyny i do powstania innych produktów (zob. schemat 1 – ścieżka b) (11). W obu szlakach degradacyjnych następuje deaminacja, po czym powstają produkty mogące wchodzić w różne szlaki metaboliczne drobnoustrojów.

SCHEMAT 1 Transformacje pirydyny (11)



Wspomniano już, że pirydyna ulega degradacji takimi samymi drogami zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych. Potwierdzeniem tego są ostatnio przeprowadzone doświadczenia z wyizolowanym szczepem, scharakteryzowanym jako nowa linia *Azoarcus evansi*, który ma zdolność degradować pirydynę zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych. Degradacja pirydyny z udziałem tego szczepu, w obu typach przemian (tlenowe i beztlenowe), przebiega w podobny sposób (schemat 1b dla *Nocardia Z1*). Zmianie ulega jedynie końcowy akceptor elektronów. Z uwagi na szerokie spektrum działania tego szczepu na różne pochodne pirydyny może być on wykorzystany na szeroką skalę do usuwania związków tych ze środowiska (8).



Transformacje pochodnych pirydyny przebiegają na innej drodze niż przekształcenia samej pirydyny. Niektóre drobnoustroje zdolne są do przekształcenia zarówno pirydyny jak i jej pochodnych, ale zawsze przemiany prowadzone są według oddzielnych, niezależnych szlaków (10). Mikroorganizmy z gatunku *Nocardia* sp. degradują pirydynę według szlaku prowadzącego do otwarcia pierścienia między C-2 a C-3, następnie zachodzi deaminacja i powstaje kwas pirogronowy. Jednakże te same drobnoustroje transformują N-tlenek pirydyny i 2-hydroksypirydynę w inny sposób. Dowiedziono, że transformacja N-tlenku pirydyny przebiega poprzez stopniową hydroksylację aż do trójhydroksypochodnej (o czym świadczy powstawanie, w wyniku utlenienia, niebieskiego barwnika) (10). Mimo różnic w początkowych przemianach, pochodne pirydyny ulegają, tak jak i pirydyna, przemianom w wyniku których następuje pęknięcie pierścienia. Ma to miejsce albo między heteroatomem a węglem C-2, lub między C-2 a C-3.

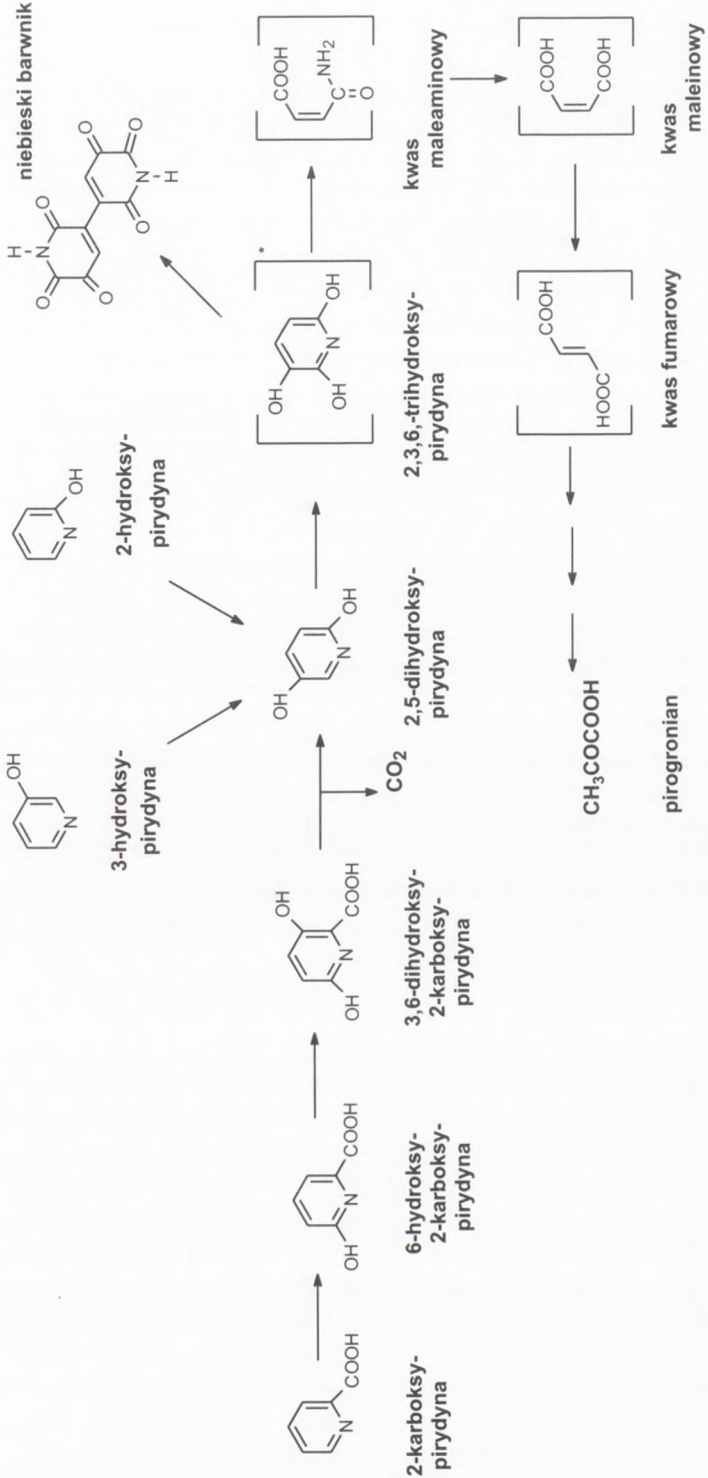
Wykazano, że **2- i 3-hydroksypirydyna** ulegają przekształceniom na tej samej drodze (transformacja przebiega poprzez formowanie 2,5-dihydroksypirydyny), ale **4-hydroksypirydyna** jest metabolizowana w odmienny sposób. Świadczy o tym fakt, że drobnoustroje zdolne do degradacji 2-hydroksy lub 3-hydroksypirydyny nie są w stanie przekształcać 4-hydroksypirydyny. Przemiany 4-hydroksypirydyny przebiegają poprzez tworzenie 3,4-dihydroksypirydyny (9). Rozcięcie pierścienia w tym przypadku następuje zatem między atomami C-2 i C-3.

Podczas degradacji hydroksylowych pochodnych pirydyny swoją działalność ujawniają zarówno dioksygenazy jak i monooksygenazy. Stechiometria reakcji między 2,5-dihydroksypirydyną a tlenem dowodzi, że w tym procesie degradacji uwalniane są dioksygenazy (*Achromobacter*). Natomiast przy degradacji 2-hydroksypirydyny prowadzonej z wykorzystaniem ekstraktu komórkowego *Arthrobacter* spp. aktywność przejawiają monooksygenazy. Na schemacie 2 przedstawiono przykłady transformacji hydroksylowych pochodnych w warunkach tlenowych. W środowisku beztlenowym transformacji ulega tylko 3-hydroksypirydyna. Oznacza to, że w tych warunkach, przemiany tej pochodnej i 2,4-hydroksypirydyny przebiegają według oddzielnych szlaków.

Przekształcenie **kwasu 2-pikolinowego** przebiega zgodnie ze ścieżką metaboliczną prowadzącą do formowania 2,5-dihydroksypirydyny i pęknięcia pierścienia między heteroatomem a węglem C-2. Przemiany te przedstawiono zbiorczo na schemacie 2.

Kwas nikotynowy (**3-karboksypirydyna**) jest degradowany poprzez rozerwanie pierścienia między atomami węgla 2 i 3. W zależności od drobnoustroju, różnie przebiega początek szlaku degradacyjnego. Biodegradację 3-karboksypirydyny prowadzoną przez szczepy *Bacillus* sp. i *Pseudomonas fluorescens* rozpoczyna hydroksylacja (powstaje 6-hydroksynikotynian). Dalej, w zależności od mikroorganizmu, powstaje 2,5-dihydroksypirydyna na drodze dekarboksylacji (*P. fluorescens*) bądź przemiany przebiegają poprzez formowanie 2,6-dihydroksynikotynianu (*Bacillus* sp.), który dalej jest przekształcany do 2,5,6-trihydroksypirydyny. Następnym etapem w obu typach degradacji, jest otwarcie pierścienia między atomami węgla C-2 i C-3 i powstaje N-formylomaleaminian. Pochodna ta ulega dalszym przekształceniom (formowanie maleaminianu, kwasu maleinowego) prowadzącym do tworzenia pirogronianu i CO<sub>2</sub> (9).

SCHEMAT 2 Schemat zbiorczy transformacji 2-hydroksypirydyny, 3-hydroksypirydyny oraz 2-karboksypirydyny (10)





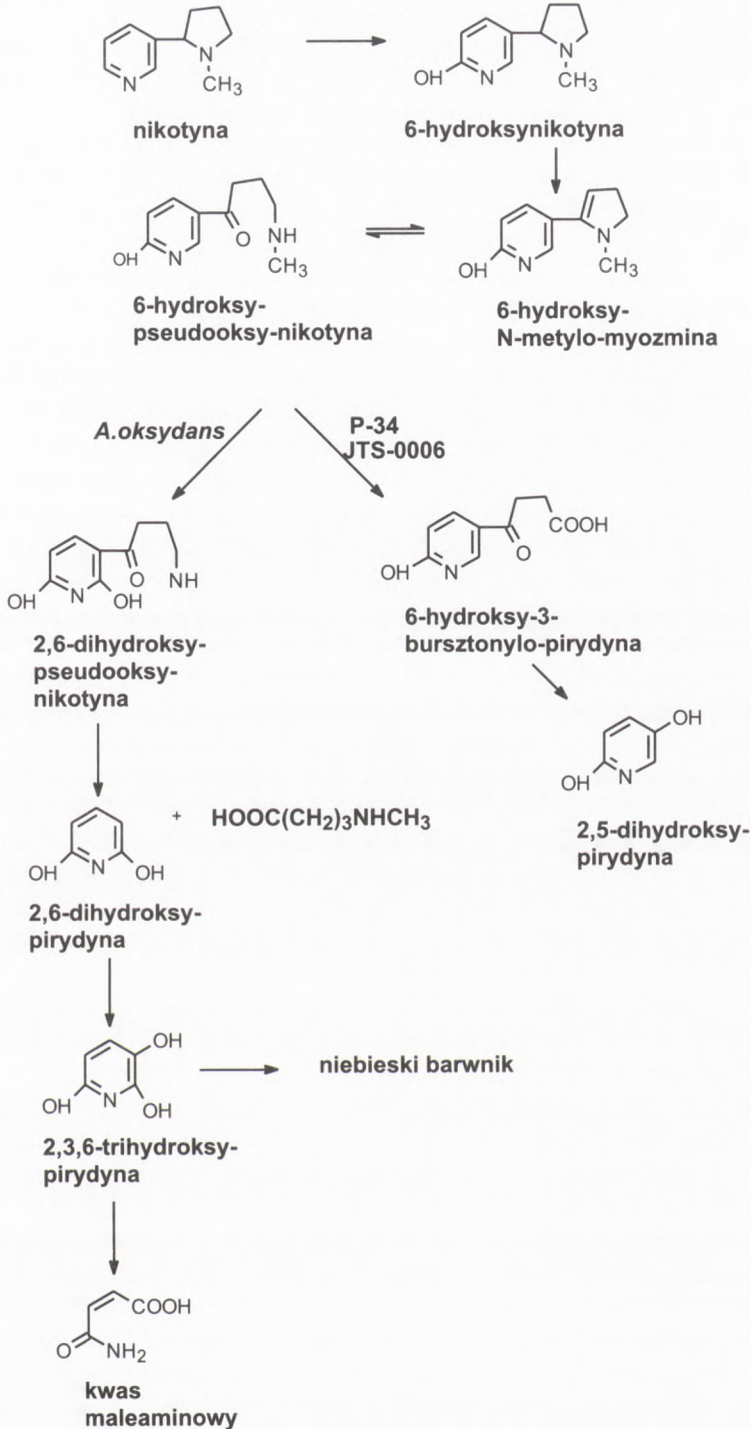
W warunkach beztlenowych kwas nikotynowy ulega innym przemianom. Mimo identycznego pierwszego etapu (powstaje 6-hydroksynikotynian), dalsze reakcje są odmienne. W warunkach beztlenowych, kwas nikotynowy przy udziale drobnoustrojów *Clostridium* sp. jest przekształcany do CO<sub>2</sub>, kwasu octowego, propionowego i amoniaku. Wyizolowano też z mułów morskich szczep *Desulfococcus niacini* posiadający zdolność wykorzystywania nikotynianu jako źródła węgla i akceptora elektronów. Degraduje on ten związek do CO<sub>2</sub> i amoniaku. W procesie nie powstaje propionian ani octan.

Nikotyna jest przekształcana na wiele sposobów. Przemianom może ulegać zarówno pierścień pirydynowy jak i pirrolidynowy. Wyizolowano z *Arthrobacter oxydans* oksydazę nikotyń, która wbudowuje atom tlenu pochodzący z wody w strukturę nikotyń dając 6-hydroksynikotyń. Z 6-hydroksynikotyń powstaje 6-hydroksypseudonikotyń. Dalej formuje się 2,6-dihydroksypseudonikotyń. Monooksygenaza katalizuje transformację tego intermediatu do 2,3,6-trihydroksypirydyny. W warunkach tlenowych i przy braku enzymu, ta trihydroksypirydyna ulega spontanicznemu utlenieniu i formuje się niebieski pigment. Barwnik ten nie powstaje w obecności ekstraktu komórkowego *A. oxydans* i trójhydroksypochodna jest przekształcana enzymatycznie do kwasu maleaminowego (schemat 3). Ta oksydaza jest enzymem indukcyjnym i wymaga obecności zredukowanego nukleotydu pirydynowego, co oznacza, że jest monooksygenazą. Sugeruje się, że przekształcenie 2,6-dihydroksypirydyny do kwasu maleaminowego wymaga obecności dwóch enzymów – oksydazy i enzymu rozrywającego pierścień aromatyczny (9,12). Podczas degradacji rozpoczynającej się od przemian w pierścieniu pirrolidynowym wstępnie powstaje N-metylomyoizmina, która jest przekształcana do pseudonikotyń. Dalej powstaje 3-bursztynylopirydyna i taki układ ulega dopiero hydroksylacji do 6-hydroksy-3-bursztynylopirydyny. Późniejsze przemiany są identyczne jak w przypadku omówionego szlaku degradacyjnego (13,14) (schemat 3).

Podsumowując, przytoczone przykłady świadczą o tym, że szybkość degradacji pochodnych pirydyny zależy od typu podstawników. Najłatwiej ulegają degradacji karboksylowe pochodne, dalej w kolejności: monohydroksy-, metylo-, aminopirydyny. Natomiast najtrudniej degradowalne są chloropirydyny.

### 3.2. Degradacje chinoliny i jej pochodnych przez drobnoustroje glebowe

Chinolina i jej pochodne są głównymi składnikami wielu środowisk wodnych zanieczyszczonych przez odpady pochodzące z konserwacji drewna (kreozot), kopalni i przetwórci paliw kopalnych. Chinolina wchodzi też w skład oleju silnikowego. Są to związki toksyczne i szkodliwe już w bardzo małych stężeniach. Stwierdzono, że sama chinolina jest przyczyną powstawania raka wątroby u myszy i szczurów (15). Powoduje też zmiany w płucach u niektórych zwierząt doświadczalnych i raka skóry u myszy (16). Przypuszcza się, że powodem takiej toksyczności jest formowanie N-tlenku chinoliny. Teorię tę popiera się też doświadczeniami nad toksycznością 2-chlorochinoliny. Nie wykazuje ona wprawdzie działania kancerogennego, ale powoduje marskość wątroby u szczurów. Brak aktywności kancerogennej 2-chlorochinoliny tłumaczy się przeszkodami przestrzennymi w tworzeniu N-tlenku 2-chlorochinoliny (15).

SCHEMAT 3 Metabolizm nikotyny przez *Arthrobacter oxydans* oraz szczepy P-34 i JTS-0006 (12)



Z uwagi na wysoką toksyczność przeprowadzono już wiele badań dotyczących degradacji chinoliny i jej pochodnych i to zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych (17-19). Tak kompleksowe badania są konieczne ponieważ warunki degradacji bardzo łatwo mogą ulec zmianie z beztlenowych na tlenowe i ważna jest, z przyczyn oczywistych, dobra znajomość szlaków metabolicznych tych związków w każdych warunkach. Do takich sytuacji dochodzi, na przykład, podczas zabiegów hydrologicznych. Beztlenowe osady w płytkich wodach stają się nagle tlenowymi jako wynik spadku poziomu wody i aktywność zyskują inne drobnoustroje niż w strefach beztlenowych (18).

Większość z drobnoustrojów zdolnych do degradacji chinoliny to *Pseudomonas* sp. (17,19,20), ale zdolność tę posiadają też *Rhodococcus* (21), *Nocardia* (10), *Moraxella* (19) i *Desulfobacterium* (22). Na podstawie przeprowadzonych badań (9,17-19) stwierdzono, że pierwszym etapem w degradacji chinoliny i to zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych, jest hydroksylacja, w wyniku której powstaje 2-hydroksychinolina. Dowiedziono, że atom tlenu potrzebny do tej reakcji pochodzi od cząsteczki wody (18). W warunkach aerobowych, tlen jest potrzebny jako ostateczny akceptor elektronów w łańcuchu oddechowym, a także do późniejszych hydroksylacji prowadzących do rozcięcia pierścienia. Reakcje te prowadzone są przez oksygenazy. W warunkach anaerobowych, związki aromatyczne mogą być degradowane przez metanogenne kultury wykorzystujące jako ostateczny akceptor elektronów, N lub S (18).

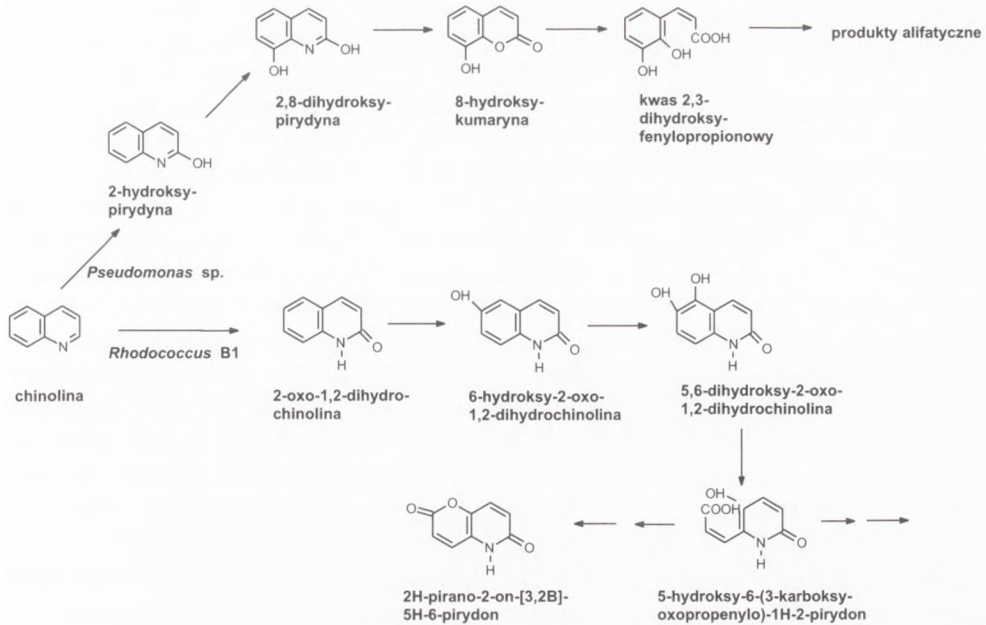
Badania nad pochodzeniem tlenu w reakcji hydroksylacji inicjującej proces degradacji, były prowadzone zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych. Aby ułatwić detekcję, w doświadczeniu użyto tzw. ciężkiej wody ( $H_2O^{18}$ ). Wykorzystano tu metanogenne kultury wyizolowane z mułów ściekowych i hodowane w ściśle beztlenowych warunkach. Kultury tlenowe wyizolowano z próbek ziem zawierających resztki kreozotu. Po wykonaniu analiz okazało się, że pochodne chinoliny (2-OH-chinolina i jej bardziej stały tautomer 2(1H)chinolonon) zawierają w swej cząsteczce „ciężki” atom tlenu  $O^{18}$  (18).

Dalsza degradacja może przebiegać według alternatywnych szlaków metabolicznych (23). Stwierdzono, że bakterie wykorzystujące chinoinę jako źródło węgla i azotu, mogą po wstępnej hydroksylacji, dalej metabolizować ten związek albo *via* 2,6-dihydroksychinoliny i dalej przez 2,5,6-trihydroksychinoliny, lub przez tworzenie 2,8-dihydroksychinoliny i 8-hydroksykumaryny. Druga z tych ścieżek metabolicznych przebiega z udziałem bakterii *Pseudomonas* sp. Produktem przejściowym jest tu kwas 2,3-dihydroksyfenylopropionowy (9). Transformacje chinoliny prowadzone przez populację *Pseudomonas* sp. oraz szczep *Rhodococcus* B1 przedstawiono na schemacie 4 (9,20).

Z przedstawionych szlaków metabolicznych wynika, że otwarcie pierścienia może nastąpić zarówno w homocyklicznej jak i w heterocyklicznej części cząsteczki. Szczep *Pseudomonas putida* transformuje oba pierścienie: homocykliczny i heterocykliczny. Kiedy atakowi ulega pierścień benzenowy powstają *cis*-dihydrodiole. Sugeruje się, że za powstawanie tych związków są odpowiedzialne dioksygenazy, a wynikiem działania mono-oksygenaz jest hydroksylowany pierścień pirydyny. Tworzenie hydroksylowych pochodnych pierścienia heterocyklicznego tłumaczy się niestabilnością *cis*-dihydrodioli tego pierścienia i ich spontaniczną dehydratacją. Chinolina ulega degradacji także w procesie metanogenezy (24). Po okresie adaptacji (6 miesięcy), drobnoustroje są w stanie całkowicie degradować chinolinę do metanu, produkty pośrednie, jak dotąd, nie są znane.



SCHEMAT 4 Degradacja chinoliny (9,20)



Z głęboko położonych osadów podpowierzchniowych wyizolowano dwa typy gramujemnych bakterii, które są w stanie mineralizować chinolinę w warunkach tlenowych. W warunkach beztlenowych, natomiast, tworzą się rozpuszczalne produkty pośrednie (17). Różnicę tę można wyjaśnić w następujący sposób. W obecności tlenu, potrzebnego do hydroksylacji pierścienia benzenowego, zachodzi pęknięcie tego pierścienia i zupełna degradacja chinoliny. Wówczas gdy brakuje tlenu nie dochodzi do rozcięcia pierścienia i nagromadzają się rozpuszczalne produkty pośrednie (17).

Typ transformacji, jakim ulegają pochodne chinoliny, w dużej mierze zależy od usytuowania podstawnika w cząsteczce tego związku. Degradację **2-karboxy-4-hydroksy-chinoliny** badano wykorzystując ekstrakt komórkowy bakterii *Pseudomonas putida*. Drobnoustroje te degradują tą pochodną chinoliny w obecności NAD. Jako produkty reakcji powstają: L-glutaminian, L-alanina, kwas octowy i dwutlenek węgla. Stwierdzono, że produktami pośrednimi są: 7,8-dihydro-(2-karboxy-4-hydroksychinolina)-7,8-diol oraz 7,8-dihydroksy-(2-karboxy-4-hydroksychinolina). Świadczy to o pęknięciu pierścienia benzenowego (25). Podobną transformację 2-karboxy-4-hydroksychinoliny przeprowadzają bakterie *Aerococcus sp.* (9).

Wspomniano już, że stopień degradacji pochodnych chinoliny zależy od położenia podstawnika w cząsteczce. Drobnoustroje wykazują różną specyficzność substratową. Większość z populacji zdolnych degradować pochodne metylowe, nie jest w stanie przekształcać 2-metylochinoliny. Wynika to zapewne z przeszkód przestrzennych. Pozycja C-2 zajęta już przez podstawnik metylowy, nie może być poddana atakowi grupy hydroksylowej. Okazuje się jednak, że istnieją drobnoustroje zdolne degradować tą pochodną



chinoliny. Opisano szlak metaboliczny **2-metylochinoliny** u *Arthrobacter* sp. (9). Wyodrębniono następujące produkty pośrednie: 1H-4-oxochinolinę, kwas N-acetyloizatowy, kwas N-acetyloantranilowy, kwas antranilowy, kwas 3-hydroksy-N-acetyloantranilowy, katechol.

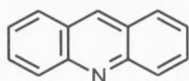
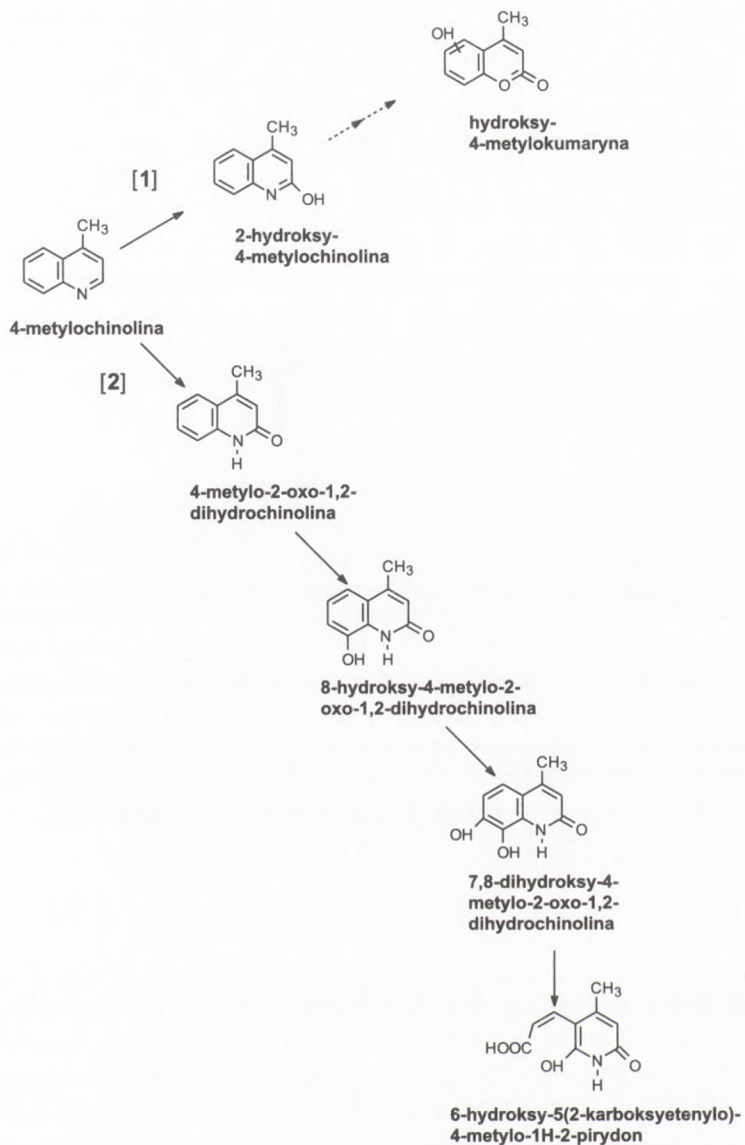
Z tekstu tego wynika, że podczas degradacji pochodnych chinoliny (podstawniki w pierścieniu pirydynowym) rozerwaniu ulega pierścień benzenowy. Nie obserwuje się alternatywnej ścieżki, w której w wyniku przemian pęka pierścień heterocykliczny. Zapewne jest to spowodowane trudnościami przestrzennymi. Zasada ta stosuje się również do transformacji **4-metylochinoliny**. Wyizolowano mieszaną populację drobnoustrojów zdolną degradować ten związek. Większość mikroorganizmów tworzących tę populację nie była w stanie degradować 4-metylochinoliny, gdy występowały jako czyste, pojedyncze szczepy. Jeden z nich, Lep1, określanej później jako *Pseudomonas* lub *Xantomonas*, posiada zdolność degradacji 4-metylochinoliny zarówno jako czysta populacja jak i w mieszaninie z innymi drobnoustrojami. Inny szczep bakterii z tego konsorcjum scharakteryzowano jako *Methylobacterium extorquenes* (6). Ci sami autorzy zaproponowali następujący szlak metaboliczny dla 4-metylochinoliny (schemat 5- ścieżka 1). Na schemacie widać, że i w tym przypadku powtarza się standardowa kolejność przemian. Pierwszym krokiem jest hydroksylacja pozycji C-2 metylochinoliny. W wyniku dalszych przemian powstaje hydroksy-4-metylokumaryna. Inni autorzy podają degradację tej samej pochodnej przez szczep *Pseudomonas putida* (9), z zajęciem pęknięcia pierścienia między C-7 a C-8 (schemat 5 ścieżka 2).

**Akrydyna** (rys. 1) wraz z 7,8-benzochinolimą i karbazolem, wchodzi w skład zanieczyszczeń, pochodzących z odpadów chemicznych przemysłu drzewnego (impregnacja drewna) (26). Akrydyna swą budową i właściwościami przypomina zarówno pirydynę jak i chinolinę. Związek ten ulega degradacji w warunkach beztlenowych przez populacje metanogenne, denitryfikacyjne i redukujące siarczany. Jednym z produktów pośrednich jest kwas benzoesowy. Według zaproponowanego, teoretycznego szlaku w warunkach beztlenowych utlenieniu ulega zarówno benzenowa jak i pirydynowa część cząsteczki. Dalej ulega przekształceniom typowym dla utlenionych związków aromatycznych: utlenieniu, redukcji, dekarboksylacji, rozerwania pierścienia i rozpadu na produkty alifatyczne (27).

### 3.3. Transformacje innych związków N-heterocyklicznych (indol, karbazol i pochodne)

Karbazol jest używany w wielu dziedzinach przemysłu (produkcja barwników, insektycydów, przemysł medyczny) stąd jego rozpowszechnienie w środowisku jest dosyć powszechne. Niewiele natomiast wiadomo o jego losach w środowisku. Jest to o tyle niepokojące, że związek ten charakteryzuje się wysoką toksycznością i przejawia aktywność mutagenną. W głównej mierze za wysoką toksyczność tego związku odpowiadają jego hydroksynitropochodne (28), natomiast za aktywność mutagenną odpowiedzialne są pochodne N-metylowe i N-hydroksymetylowe (29). Zanieczyszczenie surowej ropy naftowej karbazolem, jego alkilopochodnymi oraz innymi związkami N-heterocyklicznymi, jest poważnym problemem przemysłowym. Obecność tych pochodnych może prowadzić do zatrucia katalizatorów używanych w krakingu nafty do użytku komercyjnego. Dlatego dąży

SCHEMAT 5 Degradacji 4-metylochinoliny wg (6) [1] oraz (9) [2]



Rys. 1. Akrydyna.



się do uzyskania nafty o małej zawartości tych związków (30). Z uwagi na niepożądane efekty wywoływane przez pochodne karbazolu, konieczne jest wyizolowanie i wykorzystanie mikroorganizmów zdolnych usuwać te zanieczyszczenia ze środowiska. Generalnie, karbazol dosyć trudno ulega degradacji, jednakże wyizolowano pewną ilość drobnoustrojów posiadających zdolność transformowania tego związku (31,32). Przemiany karbazolu rozpoczyna, podobnie jak i w innych przypadkach, hydroksylacja. Pochodna powstała, w wyniku pęknięcia pierścienia heterocyklicznego ulega przekształceniu do 2'-aminobifenylo-2,3-diolu. Związek ten, w wyniku dalszych przemian (otwarcie pierścienia), jest przekształcany do kwasu antranilowego. Przemiany mogą zostać wstrzymane na tym etapie, i powstała pochodna może zostać wykorzystana do produkcji tryptofanu (33) lub, w wyniku dalszych przekształceń, karbazol może ulec całkowitemu rozkładowi do  $\text{CO}_2$  i wbudowaniu w biomasę (2). Przemiany karbazolu zilustrowano na schemacie 6 (34).

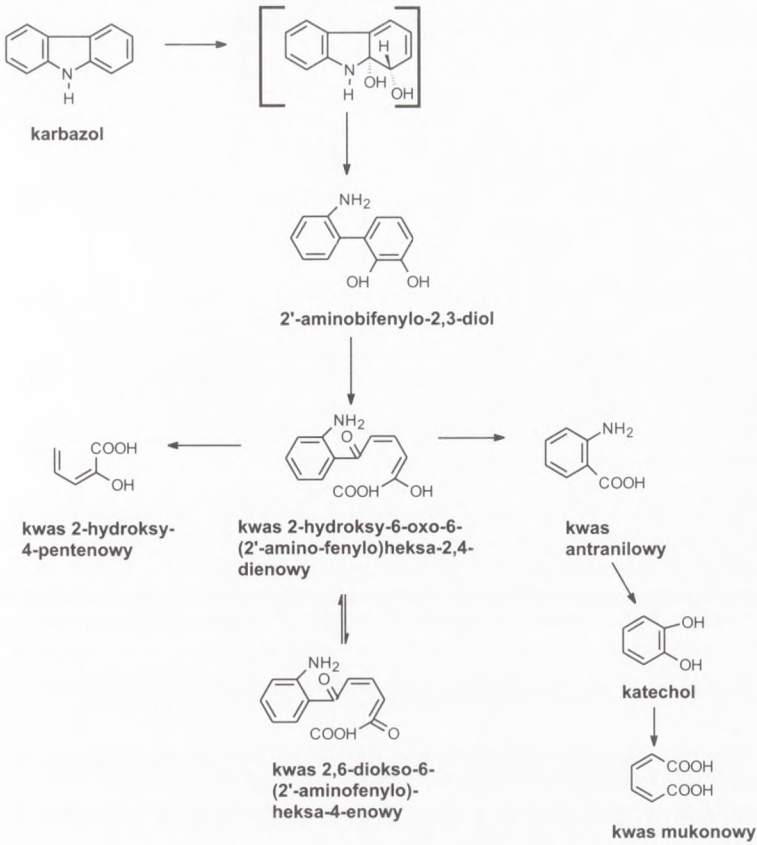
**Indol** wraz z innymi związkami N-heterocyklicznymi, stanowi odpady w dziedzinach przemysłu związanych z obróbką termiczną materiałów organicznych (rafinacja ropy, produkcja koksu). Wiele alkaloidów zawiera w swej strukturze część indolową. W przeprowadzonych badaniach dowiedziono, że indol i jego 3-metylowa pochodna ulegają degradacji w warunkach metenogennych do metanu i  $\text{CO}_2$  (35-38).

Transformacja w obu przypadkach zaczyna się hydroksylacją (powstaje 2-hydroksypochodna). Dowiedziono, że degradacja indolu przebiega poprzez dwustopniową hydroksylację dającą oksyindol, a następnie izatynę. Umożliwia to rozerwanie pierścienia pirolowego między drugim a trzecim atomem węgla (37) (schemat 7). Natomiast degradacja 3-metyloindolu przebiega według odmiennego szlaku (36). Z uwagi na zajętą przez podstawnik metylowy pozycję C-3 niemożliwe jest formowanie izatyny. Degradacja tej pochodnej wg oksyindolozatynowego szlaku wymagałaby wcześniejszej demetylacji. Takie przemiany, jak się wydaje, nie mają jednak miejsca. Przemawia za tym fakt, że drobnoustroje degradujące 3-metylową pochodną nie są w stanie utylizować indolu. Przypuszcza się, że mogą istnieć dwa różne szlaki degradacyjne indolu (36).

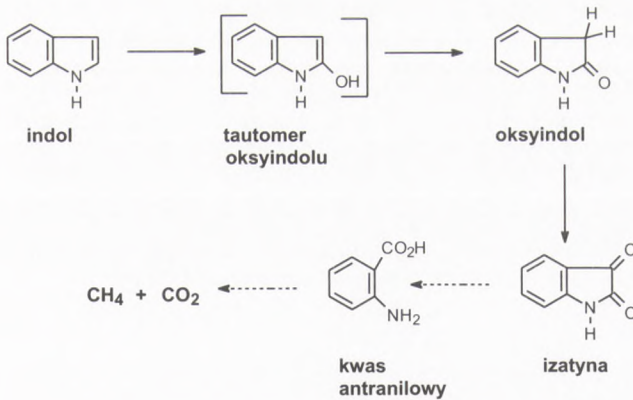
#### 4. Podsumowanie

Mikroorganizmy zdolne do przeprowadzania reakcji degradacji związków N-heterocyklicznych są szeroko rozpowszechnione w środowisku. Dobór odpowiedniego drobnoustroju zależy od efektu jaki chcemy osiągnąć (pełna degradacja czy uzyskanie produktów pośrednich). Degradacje niektórych związków, np. pirydyny, przebiegają tak samo zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych. Sposób degradacji większości związków N-heterocyklicznych zależy jednak od warunków reakcji. W większości przypadków pierwszym etapem w procesie degradacji jest hydroksylacja, która w dalszych etapach umożliwia otwarcie pierścienia heterocyklicznego bądź homocyklicznego (w zależności od typu związku). Nawet jeśli, jak w przypadku pirydyny, degradację zapoczątkowuje reakcja uwodornienia, to już degradacja pochodnych tego związku zależy od reakcji hydroksylacji. Znajomość poszczególnych szlaków degradacyjnych tych związków umożliwia opracowanie takich warunków reakcji aby wydajność procesu była zadowalająca, a koszty stosunkowo niskie. Należałoby zwrócić również uwagę na fakt, że

Schemat 6 Proponowany szlak degradacyjny karbazolu (34)



SCHEMAT 7 Proponowany szlak metanogennej fermentacji indolu przez anaerobowe konsorcja wyizolowane z przefermentowanych osadów (38)





podczas degradacji z wykorzystaniem mikroorganizmów możliwe jest wyeliminowanie tworzenia się pochodnych o podwyższonej toksyczności, co nie zawsze jest możliwe w tradycyjnych metodach utylizacji odpadów przemysłowych.

## Literatura

1. Hicks R. J. et al., (1990), *Adv. Appl. Microbiol.*, 35, 195-249.
2. Benedik M. J., Gibs P. R., Riddle R. R., Willson R. C., (1998), *Trends in Biotechnology*, 16(9), 390-395.
3. Ballag J. M., (1974), *Adv. Appl. Microbiol.*, 18, 75-130.
4. Cork Douglas J., Krueger J. P., (1991), *Adv. Appl. Microbiol.*, 36, 1-65.
5. Alexander M., (1981), *Science*, 211, 132-138.
6. Sutton S. D., Phaller S. L., Shoun J. R., Warshawsky D., Kinkle B. K., Westal J. R., (1996), *Appl. Env. Microbiol.*, 62, 2910-2914.
7. Młochowski J., (1994), *Chemia związków heterocyklicznych*, PWN, Warszawa.
8. Rhee S. K., Lee G. M., Yoon J. M., Park Y. M., Bae M. S., Lee S. T., (1997), *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 2578-2585.
9. Kaiser J. P., Feng Y., Bollag J. M., (1996), *Microbiol. Rev.*, 60, 483-498.
10. Shukla O. P., Shanti M. K., (1986), *Can. J. Microbiol.*, 32, 330-341.
11. Watson G. K., Cain R. B., (1975), *Biochem. J.*, 146, 157-172.
12. Ghera R. L., Richardson S. H., Rittenberg S. C., (1965), *J. Biol. Chem.*, 240, 3669-3674.
13. Ghera R. L., Rittenberg S. C., (1962), *Bacteriol. Proc.*, 27.
14. Maeda S., Uchida S., Kasaki T., (1978), *Agric. Biol. Chem.*, 42, 1455-1460.
15. Hirao K., Shinohara Y., Tsuda M., Fukushima S., Tokahashi M., (1976), *Can. Res.*, 36, 329-335.
16. LaVoie E. J., Dolan S., Little P., Wang C.-X., Sugie S., Rivenson A., (1988), *Food Chem. Toxicol.*, 26, 625-629.
17. Brockman F. J., Denovani B. A., Hicks R. J., Freddickson J. K., (1989), *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 1029-1032.
18. Pereira W. E., Rostad C. E., Leiker T. J., Updegraff D. M., Bennett J. L., (1988), *Appl. Env. Microbiol.*, 54, 827-829.
19. Aislabie J., Bej A. K., Hurst H., Rothenburger S., Atlas R. M., (1990), *Appl. Env. Microbiol.*, 56, 345-351.
20. Shukla O. P., (1986), *Appl. Env. Microbiol.*, 51, 1332-1342.
21. Schwartz G., Senghas E., Erben A., Schfer B., Lingens F., Hoke H., (1988), *Sys. Appl. Microbiol.*, 10, 185-190.
22. Bak F., Widdel F., (1986), *Arch. Microbiol.*, 146, 170-176.
23. Shukla O. P., (1987), *Biol. Mem.*, 115-131.
24. Wang Y. T., Suidan M. T., Pfeffer J. T., (1984), *Appl. Env. Microbiol.*, 48, 1058-1060.
25. Taniuchi H., Hayasishi O., (1963), *J. Biol. Chem.*, 238, 283-293.
26. Pereira W. E., Rostad C. E., Updegraff D. M., Bennet J. L., (1987), *Environ. Toxicol. Chem.*, 6, 163-176.
27. Knezovich J. P., Bishop D. J., Kulp T. J., Grbie-Galic D., Dewitt J., (1990), *Environ. Toxicol. Chem.*, 9, 1235-1243.
28. Arcos J. S., Argus M. F., (1968), *Adv. Cancer Res.*, 11, 305-471.
29. Yang W., Davis P. J., (1992), *Drug Metabolism and Disposition*, 20, 38-46.
30. Fedorak P. M., Westlake D. W. S., (1984), *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 858-862.
31. Gieg L. M., Otter A., Fedorak P. M., (1996), *Environ. Sci. Technol.*, 30, 575-585.
32. Grosser R., Warshawsky D., Vestal J., (1991), *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 3462-3469.
33. Hisatsuka K., Sato M., (1994), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58, 213-214.
34. Ouchiyama N., Zhang Y., Omori T., Kodama T., (1993), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57, 455-460.
35. Berry D. F., Madsen E. L., Bollag J. M., (1987), *Appl. Env. Microbiol.*, 53, 180-182.
36. Gu D., Berry D. F., (1992), *Appl. Env. Microbiol.*, 58, 2667-2669.
37. Wang Y. T., Suidan M. T., Pfeffer J. T., (1984), *Appl. Env. Microbiol.*, 48, 1058-1060.
38. Berry D. F., Francis A. J., Bollag J. M., (1987), *Microbiol. Rev.*, 51, 43-59.