

Sylwia Łabużek,
Jolanta Pająk,
Iwona Pająk

Katedra Biochemii
Uniwersytet Śląski
Katowice

Rozkład fenolu i cyjanku potasu przez bakterie rodzaju *Pseudomonas*

1. Wstęp

Związki fenolowe i cyjanki należą do jednych z najbardziej uciążliwych składników wód ściekowych, odpadowych wód technologicznych. Często występują obok siebie, jak np. w wodach przemysłu hutniczego czy koksowniczego. Istniałaby zatem możliwość ich wspólnego rozkładu na drodze kometabolizmu przez niektóre drobnoustroje osadu czynnego w instalacjach biotechnologicznych.

Proces równoczesnego rozkładu związków przez drobnoustroje dość powszechnie występuje w środowisku wodnym i glebowym (1,2,3). Najczęściej związane to jest z detoksykacją ksenobiotyków syntetycznych, trudno rozpuszczalnych związków organicznych, również z degradacją związków zawierających grupy CN^- . Dla zjawiska tego przyjęto termin kometabolizm, gdy rozkładowi towarzyszy przekształcenie substancji nie podtrzymującej wzrostu (4). Zasadniczym kryterium kometabolizmu jest metaboliczna i energetyczna bezużyteczność procesów, którym podlegają te związki. Tą drogą udało się zdegradować wiele związków uciążliwych dla środowiska jak chlorowcopochodne benzenu, fenantren (1,5,19).

Wśród bakterii rodzaju *Pseudomonas* znajdują się szczepy rozkładające związki fenolowe (6,10,16) oraz gatunki degradujące cyjanek (9,18). Nie ma doniesień o równoczesnym rozkładzie związków aromatycznych i cyjaneków na drodze kometabolizmu przez te bakterie.

Rozkład związków fenolowych wynika z możliwości indukcyjnej syntezy enzymów, które katalizują przemiany tych związków. W warunkach tlenowych związki fenolowe mogą stanowić jedyne źródło węgla i energii dla niektórych drobnoustrojów, np. bakterii *Pseudomonas sp.* Rozkład tych związków powoduje wzrost bakterii.

Rozkład cyjanku przez drobnoustroje uważany jest za proces detoksykacji (7,2). Proces rozkładu tego związku badano w ostatnich latach z użyciem różnych szczepów *Pseudomonas sp.* (7,8,9). Cyjanek nie był jednak wystarczającym źródłem węgla dla wzrostu badanych bakterii (9), i do wzrostu hodowli wymagał dodatkowego substratu.

Związki fenolowe i cyjanki występujące wspólnie jako zanieczyszczenia wód powierzchniowych mogą być rozkładane przez mieszane populacje drobnoustrojów (10). Interesujące wydawało się stwierdzenie, że proces ten może powodować jeden szczep bakterii.

Celem pracy było wykazanie możliwości rozkładu fenolu i cyjanku przez niektóre szczepy *Pseudomonas sp.* w układzie dwuskładnikowym. Układ taki zawierał związek fenolowy, który stanowił źródło węgla i energii oraz cyjanek będący potencjalnym kometabolitem.

2. Metodyka badań

W badaniach stosowano trzy szczepy rodzaju *Pseudomonas*. Szczep *Pseudomonas putida* izolowany przez Mrozowską (11) z mieszanej populacji drobnoustrojów osadu czynnego degradującej związki fenolowe, szczep *Pseudomonas sp.* C1 izolowany przez Pawlikowską (9) z osadu czynnego adaptowanego do rozkładu cyjaneków oraz szczep *Pseudomonas sp.* FC5 izolowany z mieszanej populacji drobnoustrojów osadu czynnego adaptowanej do degradacji fenolu i cyjanku. Użyto również osadu czynnego, który adaptowano do degradacji cyjanku i fenolu w układzie dwuskładnikowym.

W badaniach degradacyjnych stosowano zmodyfikowaną pożywkę Kojima i in. (12), w której w miejsce chlorku amonu wprowadzano chlorek sodu. Pożywkę wzbogacano fenolem, stanowiącym źródło węgla i energii lub cyjankiem, który był jedynym źródłem azotu.

Przebieg degradacji fenolu prowadzono metodami analitycznymi (13). Metodę kolorymetryczną stosowano do obserwacji rozkładu cyjanku (14). Biomassę drobnoustrojów oznaczano metodą filtrów membranowych (15), zaś wzrost hodowli przez pomiar zmętnienia hodowli (16).

Indukcję enzymatyczną badanych drobnoustrojów do degradacji fenolu, cyjanku lub mieszaniny obu związków prowadzono w warunkach periodycznych hodowli napowietrzanych z codziennym zasilaniem substratów (16).

Badania dynamiki biodegradacji fenolu, cyjanku lub mieszaniny obu tych związków prowadzono metodą opisaną przez Łabużek (16).

Do obserwacji krzywych wzrostu używano kolbek Vincenta o objętości 100 ml służących do bezpośredniego pomiaru mętności hodowli. Do kolbek wprowadzano podłoże, w którym miał wzrastać szczep, w zależności od mętności wyjściowej od 8 do 15 ml. Kolbki zaszczipiano zawiesiną bakterii do końcowej objętości 20 ml. Mętność mierzono spektrofotometrycznie na specolu z przystawką zmętnieniową TR. Do kolbek zawierających podłoże i zawiesinę bakterii wprowadzono badany związek o odpowiednim stężeniu. Hodowlę inkubowano z wytrząsaniem w 30° C. Pomiaru zmętnienia hodowli dokonywano w odstępach 1 lub 2-godzinnych przez 12 godzin, a następnie w odstępach dobowych.

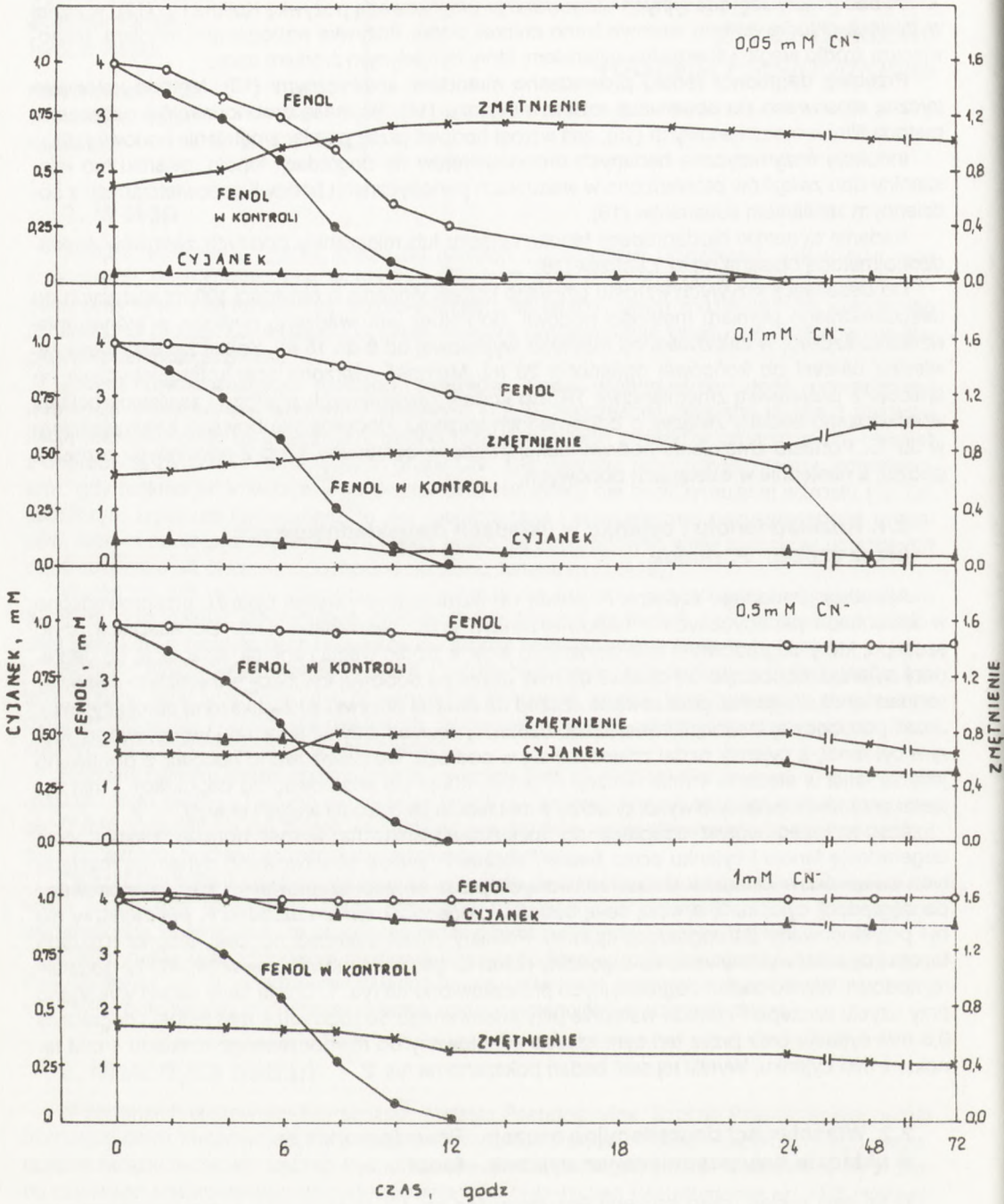
2.1. Rozkład fenolu i cyjanku w układach dwuskładnikowych przez szczep *P. putida*

Adaptację badanego szczepu *P. putida* do wzrastających stężeń cyjanku przeprowadzono w warunkach periodycznych z napowietrzaniem przez wytrząsanie (16). Do adaptacji użyto szczepu, który degradował 4 mM fenolu jako jedyne źródło węgla i energii. Adaptację do degradacji cyjanku rozpoczęto od dawki 0,05 mM. Jeżeli po dobowej inkubacji stwierdzano całkowity rozkład fenolu i cyjanku, pasażowano szczep do świeżej pożywki ze zwiększoną porcją cyjanku. Jeżeli po dobowej inkubacji stwierdzano całkowity rozkład jedynie substratu wzrostowego, którym był fenol, a cyjanek nadal znajdował się w podłożu, nie pasażowano hodowli, a dodawano jedynie fenol w stężeniu 4 mM. Szczep *P. putida* udało się adaptować do degradacji 1 mM cyjanku przy równoczesnym wykorzystaniu 4 mM fenolu jako źródła węgla i energii.

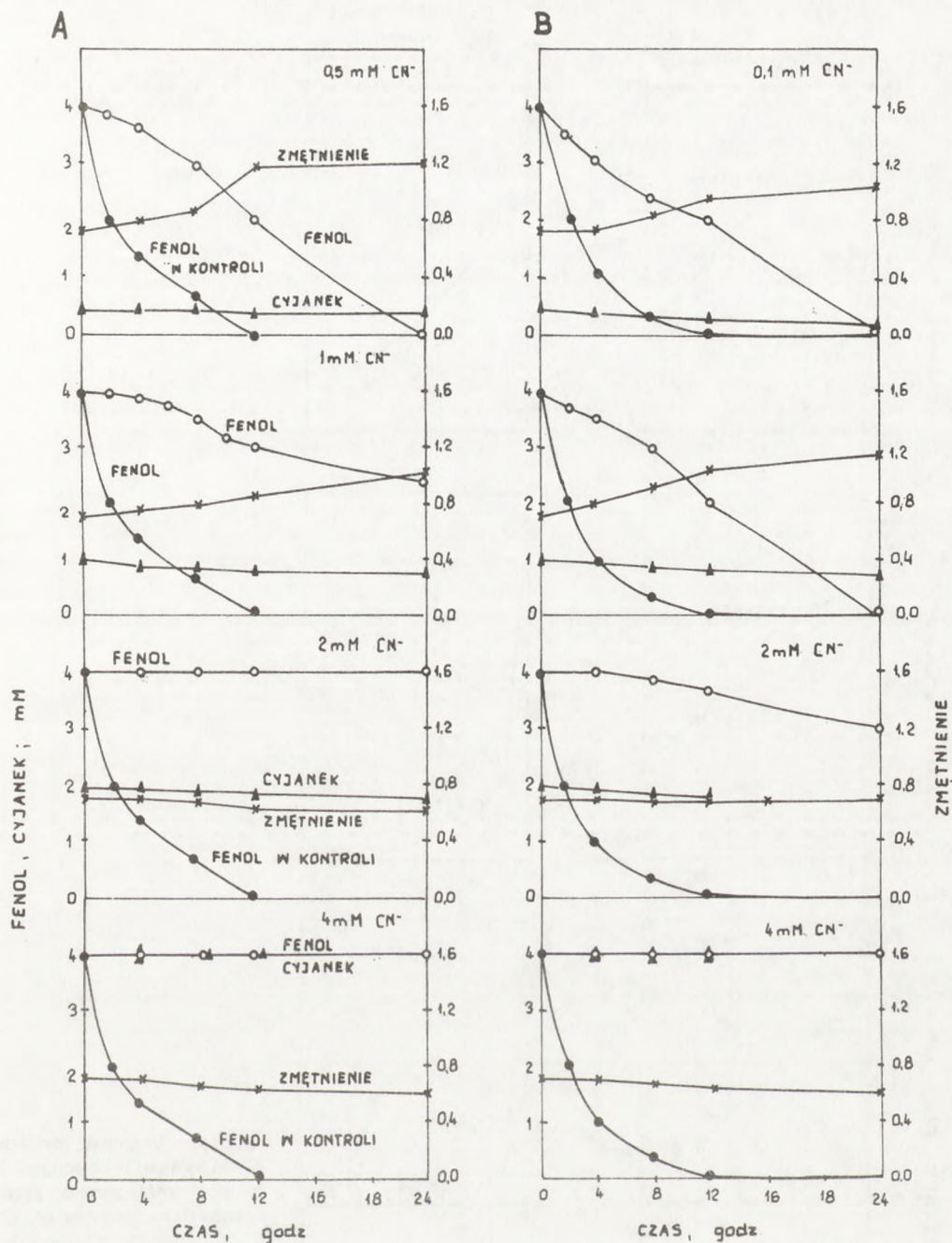
Aby wykazać wpływ adaptacji do rozkładu cyjanku na wzrost hodowli bakterii oraz degradację fenolu i cyjanku przez badany szczep *P. putida* obserwowano dynamikę rozkładu tych związków w układach dwuskładnikowych przez szczep adaptowany i nie przystosowany do degradacji cyjanku. Pierwszą serię badań wykonano z użyciem szczepu *P. putida*, który nie był przystosowany do degradacji cyjanku. Pomiaru zmian mętności hodowli, stopnia rozkładu fenolu i cyjanku wykonywano co 2 godziny przez 12 godzin inkubacji oraz w 24, 48 i 72 godzinie tej hodowli. Wyniki badań degradacyjnych przedstawiono na rys. 1. Drugą serię badań wykonano przy użyciu szczepu *P. putida* wstępnie przystosowanego do rozkładu 4 mM fenolu i degradacji 0,5 mM cyjanku oraz przez ten sam szczep adaptowany do równoczesnego rozkładu 4 mM fenolu i 1 mM cyjanku. Wyniki tej serii badań pokazano na rys. 2.

2.2. Właściwości degradacyjne szczepu *Pseudomonas* sp. w układzie dwuskładnikowym cyjanek – fenol

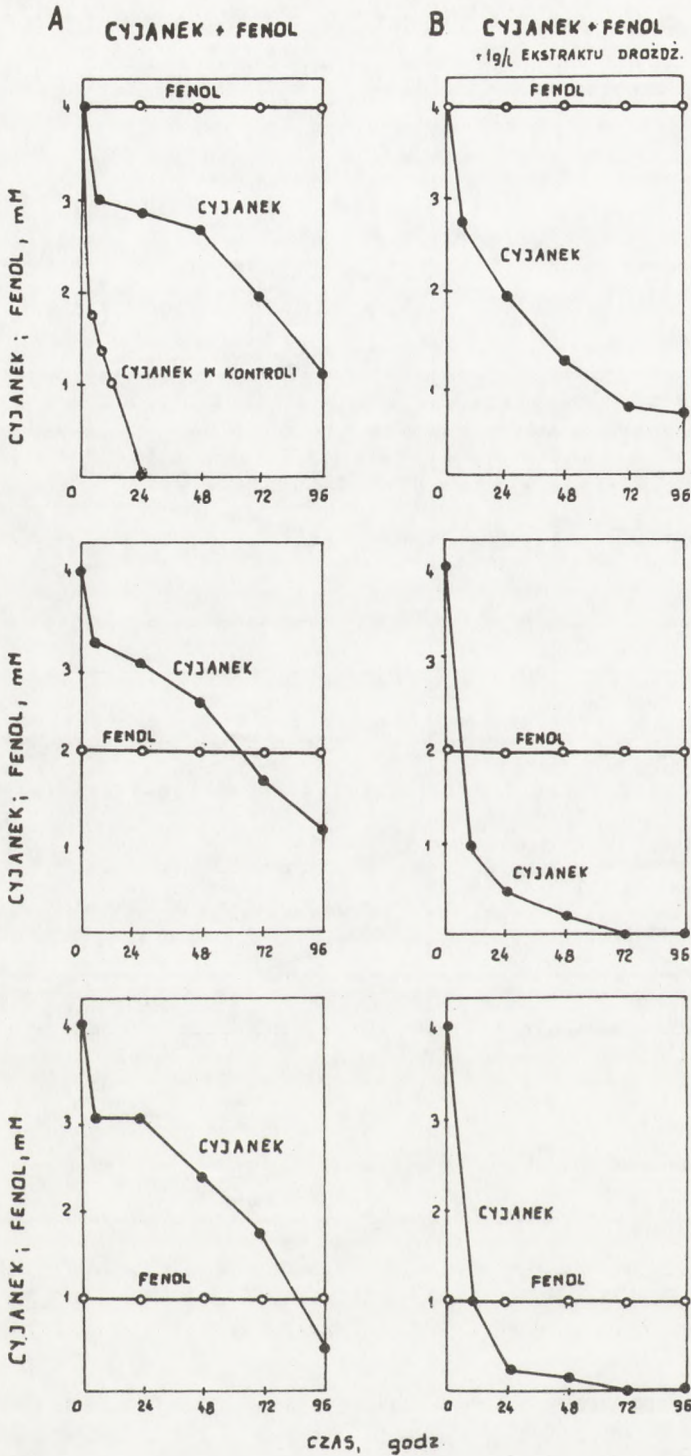
W tej serii badań użyto szczepu *Pseudomonas* sp. C1 izolowanego z populacji mieszanej drobnoustrojów osadu czynnego adaptowanego do rozkładu cyjanku (8). Szczep ten wstępnie indukowano do rozkładu 4 mM cyjanku w cyklu dobowym w obecności ekstraktu drożdżowego jako dodatkowego źródła węgla (9). W celu stwierdzenia, czy badany szczep *Pseudomonas* sp.



Rys.1. Krzywe wzrostu i dynamiki degradacji 4 mM fenolu i zmiennych stężeń cyjanku od 0,05 do 4 mM przez szczep *P. putida*, wstępnie adaptowany do degradacji fenolu.



Rys. 2. Krzywe wzrostu i dynamiki degradacji 4 mM fenolu i zmiennych stężeń cyjanku od 0,5 do 4 mM przez szczep *P. putida*, wstępnie adaptowany do degradacji: A – 4 mM fenolu i 0,5 mM cyjanku; B – 4 mM fenolu i 1 mM cyjanku.



Rys. 3. Dynamika rozkładu 4 mM cyjanku w obecności 1, 2 lub 4mM fenolu przez szczep *Pseudomonas* sp. C1 A – w mineralnej części pożywki Kojima i in.; B – w pełnej pożywce Kojima i in. (12) (1g/dcm³ ekstraktu drożdżowego).

móglby wykorzystywać fenol jako źródło węgla, prowadzono hodowlę tego szczepu w układach dwuskładnikowych zawierających fenol obok cyjanku. Do mineralnej części pożywki Kojima (12) dodawano 4 mM cyjanku oraz 0,2; 1; 2 lub 4 mM fenolu. Do takiego medium hodowlanego wprowadzano zawiesinę bakterii szczepu *Pseudomonas sp.*, w takim stężeniu, by mętność wyjściowa utrzymywała się w granicach 0,9–1, co odpowiadało biomacie około 300–350 mg/dcm³. Hodowlę prowadzono w 30°C z napowietrzaniem przez wytrząsanie. Codziennie oznaczano stężenie fenolu, mętność hodowli oraz stężenie cyjanku. Hodowlę prowadzono do momentu, gdy mętność jej spadała do 0,4. Metodą tą nie udało się adaptować szczepu *Pseudomonas sp. C1* do wykorzystania fenolu jako substratu wzrostowego.

Wstępną adaptację szczepu *Pseudomonas sp. C1* do rozkładu cyjanku prowadzono w obecności ekstraktu drożdżowego jako dodatkowego źródła węgla. Powtórzono zatem doświadczenie, którego celem była adaptacja badanego szczepu bakterii do wykorzystania fenolu, wprowadzając do hodowli oprócz cyjanku i fenolu również ekstrakt drożdżowy. Układ hodowlany zawierał mineralną część pożywki Kojima (12), 4 mM cyjanku, 1g/dcm³ ekstraktu drożdżowego oraz fenol w stężeniach 0,2; 1; 2 lub 4 mM. Również w takich warunkach obserwacji nie udało się adaptować użytego szczepu do wykorzystania fenolu jako źródła węgla.

W trakcie dalszych badań postanowiono sprawdzić, czy w wyniku zabiegów adaptacyjnych do rozkładu fenolu nie zmieniły się zdolności badanego szczepu do rozkładu cyjanku. Przeprowadzono więc obserwacje dynamiki rozkładu 4 mM cyjanku w obecności 1; 2 lub 4 mM fenolu przez szczep *Pseudomonas sp. C1*. Zastosowano dwa podłoża hodowlane. W jednej serii użyto mineralnej części zmodyfikowanej pożywki Kojima z dodatkiem 4 mM cyjanku i 1; 2 lub 4 mM fenolu. W drugiej serii dodatkowo do podłoża hodowlanego wprowadzono 1g/dcm³ ekstraktu drożdżowego. Wyniki tych obserwacji ilustruje rys. 3.

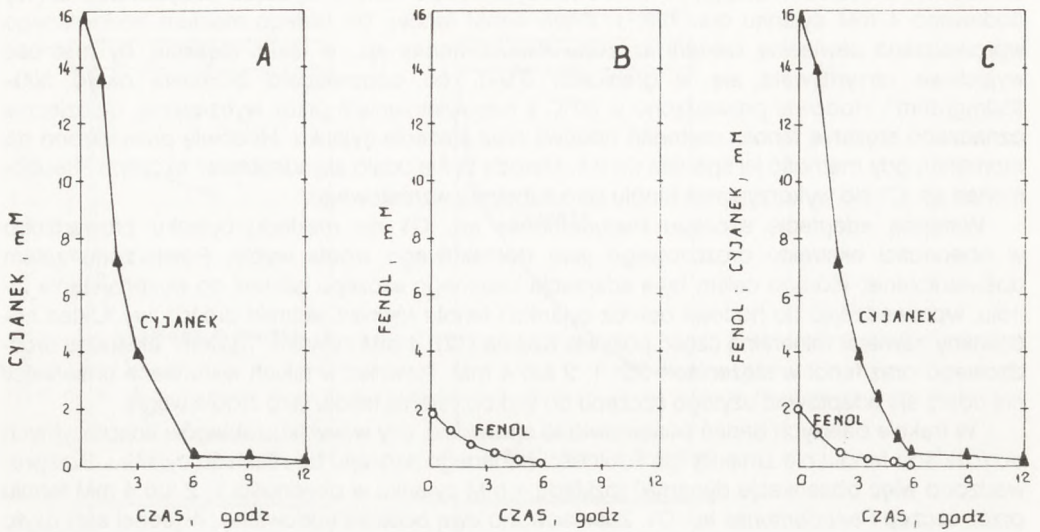
2.3. Równoczesny rozkład fenolu i cyjanku przez mieszaną populację drobnoustrojów i szczep *Pseudomonas sp.* izolowany z tej populacji

Drobnoustroje populacji mieszanej zdolne do równoczesnego rozkładu fenolu i cyjanku używano przez aklimatyzację mikroorganizmów osadów organicznych poddanych fermentacji metanowej. Osady te transformowano w osad czynny przez kilkudniową aerację.

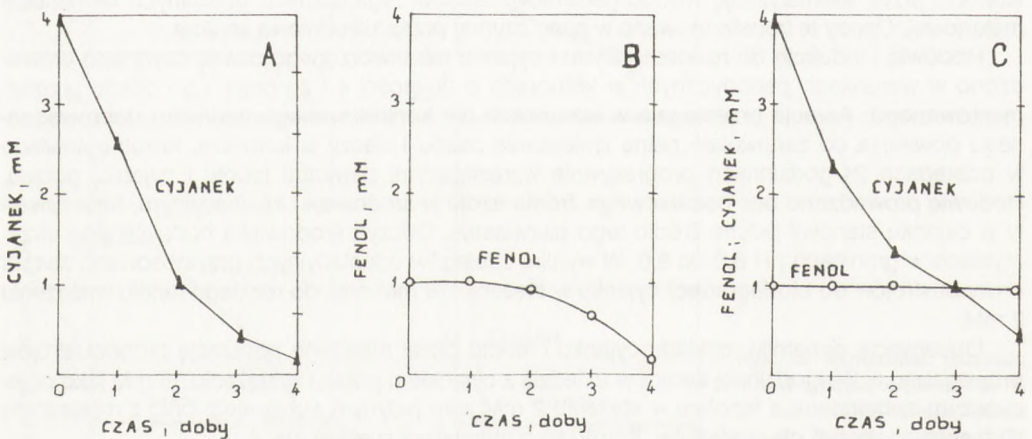
Hodowlę i indukcję do rozkładu fenolu i cyjanku tak utworzonego osadu czynnego prowadzono w warunkach periodycznych w komorach o objętości 4 l z porcją 1,5 l osadu przefermentowanego. Aeracja przebiegała w warunkach nie kontrolowanego nadmiaru doprowadzanego powietrza co zapewniało pełne zmieszanie osadu i cieczy w komorze. Komorę zasilano w odstępach 24-godzinnych progresywnie wzrastającymi dawkami fenolu i cyjanku potasu. Hodowlę prowadzono bez dodatkowego źródła azotu w środowisku inkubacyjnym. Azot zawarty w cyjanku stanowił jedyne źródło tego pierwiastka. Odczyn środowiska hodowlanego utrzymywano w granicach pH 8,0 do 9,0. W wyniku zabiegów adaptacyjnych przystosowano zespół drobnoustrojów do biodegradacji cyjanku w stężeniu 16 mM oraz do rozkładu fenolu w stężeniu 2 mM.

Obserwację dynamiki rozkładu cyjanku i fenolu przez mieszaną populację drobnoustrojów prowadzono w 24-godzinnej aeracji w układzie z cyjankiem potasu w stężeniu 16 mM jako pojedynczym substratem, z fenolem w stężeniu 2 mM jako jedynym substratem oraz z mieszaniną tych samych stężeń obu związków. Wyniki tych obserwacji ilustruje rys. 4.

Z mieszanej populacji drobnoustrojów o wysokiej aktywności degradacyjnej izolowano szczepy bakterii zdolne do degradacji fenolu i cyjanku metodą opisaną przez Pawlikowską (8). Tylko jedna z wyodrębnionych kultur bakterii, oznaczona jako szczep *Pseudomonas sp. FC5*, powodowała równoczesny rozkład cyjanku i fenolu.



Rys. 4. Dynamika rozkładu cyjanku w stężeniu 16 mM (1040 mg/dm^3 KCN) i fenolu w stężeniu 2 mM (188 mg/dm^3) przez drobnoustroje osadu czynnego w układach: A – z cyjankiem; B – z fenolem; C – z cyjankiem i fenolem.



Rys.5. Rozkład cyjanku i fenolu przez szczep *Pseudomonas sp.* FC5 w mineralnej części pożywki Kojima i in. (12) w układach: A – z cyjankiem w stężeniu 4 mM; B – z fenolem w stężeniu 1 mM; C – z cyjankiem w stężeniu 4 mM i fenolem w stężeniu 1 mM.

Szczep ten użyto do dalszych badań biodegradacyjnych. Przeprowadzono obserwacje degradacji przez ten szczep, cyjanku potasu i fenolu w układach jedno- i dwuskładnikowych, z cyjankiem w stężeniu 4 mM, fenolem w stężeniu 1 mM oraz mieszaniną obu tych związków. Obserwacje prowadzono w sposób analogiczny jak w poprzednich seriach badań. Wyniki tych obserwacji pokazano na rys. 5.

3. Wyniki i ich dyskusja

Przeprowadzone badania miały na celu stwierdzenie możliwości równoczesnego wykorzystania fenolu i cyjanku jako substratów wzrostowych oraz wykazanie wzajemnego wpływu tych związków na zdolności biodegradacyjne trzech wybranych szczepów bakterii rodzaju *Pseudomonas*.

Jednym z użytych w badaniach był szczep *P. putida*, izolowany przez Mrozowską (1976) z mieszanej populacji drobnoustrojów degradujących fenole wód koksowniczych. W wodach tych obok fenoli występowały cyjanki (10). Szczep ten udało się przystosować do wzrostu i wykorzystania fenolu w obecności cyjanku przez równoczesną aklimatyzację do 4 mM fenolu i 0,5 mM lub 1,0 mM cyjanku. Dalsze zwiększanie stężenia cyjanku w hodowli powodowało znaczne wydłużanie czasu degradacji fenolu. Ograniczono się zatem w badaniach degradacyjnych do użycia szczepu *P. putida*, gdy był przystosowany do równoczesnego rozkładu 4 mM fenolu i 0,5 lub 1,0 mM cyjanku (rys. 2) lub tylko do rozkładu 4 mM fenolu (rys. 1). Obserwowano krzywe wzrostu oraz dynamikę równoczesnego rozkładu fenolu i cyjanku przez badany szczep w dwuskładnikowym układzie hodowlanym zawierającym mieszaninę 4 mM fenolu i zmienne stężenia cyjanku.

Dynamika rozkładu 4 mM fenolu w obecności 0,5 mM cyjanku przez szczep *P. putida* adaptowany do 0,5 lub 1 mM cyjanku przebiegał podobnie. Fenol ulegał rozkładowi w ciągu 24 godzin w obu hodowlach (rys. 2A i 2B). Obserwowano dwukrotne wydłużenie czasu degradacji fenolu w porównaniu z kontrolą, którą stanowiła hodowla badanego szczepu zasilanego tylko 4 mM fenolu. Cyjanek w tych mieszaninach ulegał bardzo powolnemu usunięciu, które należałoby wiązać z procesami fizyko-chemicznymi. Jeżeli do hodowli szczepów adaptowanych do 4 mM fenolu i 0,5 mM cyjanku wprowadzono wyższe stężenia cyjanku, obserwowano silne zahamowanie szybkości rozkładu fenolu. Również cyjanek nie ulegał wyraźnemu usunięciu przez ten szczep (rys. 2A).

Podobnie zachowywał się szczep adaptowany wstępnie do 4 mM fenolu i 1 mM cyjanku. W obecności takich stężeń obu związków wydłużała się degradacja fenolu w stosunku do kontroli (rys. 2B). Wyższe stężenia cyjanku niż 1 mM powodowały hamowanie degradacji fenolu. Hamowanie było większe przy wyższych stężeniach cyjanku. Dla kultur wstępnie adaptowanych do 4 mM fenolu i 0,5 mM cyjanku, stężenie 2 mM cyjanku w hodowlach powodowało całkowite zahamowanie wzrostu bakterii, rozkładu fenolu oraz usunięcia cyjanku (rys. 2A). Kultury wstępnie adaptowane do 4 mM fenolu i 1 mM cyjanku wykazywały całkowite hamowanie wzrostu, degradacji fenolu i cyjanku przy stężeniu 4 mM cyjanku w hodowli (rys. 2B). Niższe stężenia cyjanku powodowały wydłużanie czasu degradacji fenolu, ale nie hamowały w pełni procesów wzrostowych bakterii.

Szczep *P. putida* wstępnie adaptowany wyłącznie do rozkładu 4 mM fenolu tolerował znacznie niższe stężenia cyjanku w układach hodowlanych (rys. 1). Już stężenie 0,05 i 0,1 mM cyjanku powodowało wydłużenie degradacji fenolu odpowiednio o 12 lub 24 godziny w porównaniu z hodowlą kontrolną. Wyższe stężenia cyjanku od 0,5 mM były toksyczne dla tych kultur badanego szczepu. Obserwowano bowiem zahamowanie wzrostu i brak rozkładu fenolu (rys. 1).

Wykazano, że zdolność rozkładu fenolu jako jedyne źródła węgla i energii obok cyjanku – składnika nie podtrzymującego wzrostu, uzależniona była od stopnia adaptacji do cyjanku. Wprowadzenie cyjanku do hodowli w stężeniach niższych lub równych stężeniu, do którego

szczep był wcześniej adaptowany, powodowały przedłużenie czasu rozkładu związku fenolowego w porównaniu z kontrolną hodowlą. Zwiększenie stężenia cyjanku powyżej wartości, do której szczep był wstępnie przystosowany, powodowało gwałtowne zmniejszanie szybkości rozkładu substratu wzrostowego aż do pełnego zahamowania. Cyjanek, który był częściowo usuwany po długotrwałej adaptacji, nie podtrzymywał wzrostu bakterii (rys. 1 i 2). W wyniku przeprowadzonych badań z użyciem szczepu *P. putida* nie udało się znaleźć warunków indukcji umożliwiających równoczesny, aktywny rozkład fenolu i cyjanku. Szczep ten w wyniku adaptacji tolerował niskie stężenia cyjanku, zachowując zdolność degradacji fenolu.

W kolejnej serii obserwacji użyto szczepu *Pseudomonas sp.* C1 izolowanego z mieszanej populacji drobnoustrojów aktywnie rozkładających cyjanek. Szczep ten był indukcyjnie przystosowany do degradacji cyjanku w obecności dodatkowego źródła węgla, na przykład ekstraktu drożdżowego. Wcześniejsze informacje dotyczące mieszanej populacji drobnoustrojów (10) oraz izolowanego szczepu (9) wykazały, że cyjanek jest niewystarczającym źródłem węgla w procesach wzrostowych. Z powodów wynikających ze wspólnego występowania fenolu obok cyjanku w koksowniczych wodach fenolowych, interesujący był fenol jako ewentualne źródło węgla w procesach mikrobiologicznej degradacji cyjanku.

Podjęto próbę wtórnej adaptacji szczepu *Pseudomonas sp.* C1, wstępnie adaptowanego do cyjanku, do rozkładu fenolu w układzie nie zawierającym cyjanku. Fenol wprowadzany w stężeniach 1, 2 lub 4 mM w obecności lub bez dodatku 1 g/dcm³ ekstraktu drożdżowego w medium hodowlanym, nie podlegał degradacji przez badany szczep. Wielodobowe obserwacje wykazały, że szczep *Pseudomonas sp.* nie uzyskiwał zdolności do rozkładu fenolu. Obserwacje wpływu obecności różnych stężeń fenolu na degradację cyjanku przez ten szczep, wykazały niewielkie różnice przebiegu rozkładu cyjanku pod wpływem zmiennych stężeń fenolu w układzie hodowlanym bez dodatkowego źródła węgla (rys. 3A). We wszystkich trzech hodowlach obserwowano znaczne zahamowanie właściwości biodegradacyjnych szczepu *Pseudomonas sp.* Porcja 4 mM cyjanku nie ulegała rozkładowi pełnemu nawet w ciągu 96 godzin, niezależnie od tego, czy fenolu było w podłożu hodowlanym 1, 2 czy 4 mM (rys. 3A). Ta sama ilość cyjanku była rozkładana w hodowli kontrolnej bez dodatku fenolu. Obecność ekstraktu drożdżowego w podłożu hodowlanym, ujawniała hamujący wpływ fenolu na degradację cyjanku (rys. 3B). Ze wzrostem stężenia fenolu w medium hodowlanym, wydłużał się czas degradacji cyjanku, ale degradacja przebiegała. Obecność 1 i 2 mM fenolu powodowała wydłużenie czasu rozkładu porcji 4 mM cyjanku do 72 godzin. Stężenie 4 mM fenolu w hodowli powodowało, że w ciągu 96 godzin od momentu dodania, cyjanek nie ulegał pełnej degradacji (rys. 3B). Jednakże, nawet tak duże stężenie fenolu (4mM), nie hamowało w pełni zdolności degradacyjnych badanego szczepu w obecności innego, łatwo przyswajalnego źródła węgla w procesie degradacji cyjanku.

Podjęto poszukiwanie innego szczepu bakterii zdolnego do równoczesnej degradacji cyjanku i fenolu. W tym celu adaptowano mieszaną populację drobnoustrojów osadu czynnego do degradacji fenolu i cyjanku potasu w układzie dwuskładnikowym. Spodziewano się, że drogą selekcji możliwe będzie uzyskanie szczepu wykazującego zdolność rozkładu obu tych związków równocześnie. Drogą adaptacji uzyskano mieszaną populację osadu czynnego, która w cyklu 24-godzinnym degradowała 16 mM cyjanku (1040 mg/dcm³) oraz 2 mM fenolu (188 mg/dcm³). Badania rozkładu obu tych substratów zarówno w układach, w których fenol lub cyjanek były jedynym substratem w pożywce mineralnej, jak i w układach dwusubstratowych. Obydwa te związki były rozkładane w czasie 6 do 12 godzin (rys. 4).

Przeprowadzona izolacja, dominujących w tej populacji szczepów bakterii, pozwoliła uzyskać 6 szczepów różniących się morfologicznie. Uzyskane szczepy poddano próbie, która miała wykazać możliwość równoczesnego rozkładu fenolu i cyjanku. Tylko jeden ze szczepów, oznaczony roboczo FC5 i wstępnie zidentyfikowany jako należący do rodzaju *Pseudomonas*, był zdolny do równoczesnego rozkładu 4 mM cyjanku i 1 mM fenolu. Stwierdzono, że rozkład cyjan-

ku przez ten szczep charakteryzował się zwiększoną intensywnością w porównaniu z rozkładem fenolu. Badania degradacyjne z użyciem szczepu FC5 wykazały, że szczep, który w początkowym okresie po izolacji wykazywał wysoką zdolność rozkładu obu związków, po okresie około 3 tygodni hodowli nadal utrzymywał wysoką zdolność rozkładu cyjanku potasu, mniejszą natomiast zdolność rozkładu fenolu (rys. 5). Cyjanek (4 mM) lub fenol (1 mM) w układzie jednosubstratowym ulegały rozkładowi w ciągu 4 dób, przy czym degradacja fenolu była poprzedzona 2-dniową fazą lag (rys. 5 B). W układzie dwuskładnikowym, fenol–cyjjanek, cyjanek był degradowany, natomiast fenol nie (rys. 5 C).

Obserwacje zdolności biodegradacyjnych izolowanego szczepu *Pseudomonas sp.* FC5 wykazały, że szczep ten rozkładał fenol i cyjanek w układzie dwuskładnikowym, bezpośrednio po izolacji. W późniejszym okresie hodowli wykazywał zdolność rozkładu fenolu i cyjanku w układzie jednosubstratowym, przy czym rozkładowi fenolu towarzyszył wzrost bakterii. W układzie dwusubstratowym rozkładany był tylko cyjanek w warunkach bezwzrostowych.

3.1. Ocena równoczesnego rozkładu cyjanku i fenolu przez badane szczepy *Pseudomonas sp.* jako proces kometabolizmu tych związków

Mikroorganizmy występujące powszechnie w ekosystemach naturalnych stykają się z wieloma substancjami o działaniu toksycznym, np. z cyjankiem lub fenolem, wobec których wykształcają mechanizmy obronne, polegające na rozkładzie lub detoksykacji tych związków. Jednym z mechanizmów wiążących się z detoksykacją jest zjawisko kometabolizmu (1,3). Uważa się, że kometabolizm jest to przekształcenie związków toksycznych nie podtrzymujących wzrostu w obecności substratu wzrostowego, ulegającego metabolicznemu przekształceniu (4,17).

W pierwszej części przeprowadzonych badań użyto szczepu *P. putida*, który wykorzystywał fenol jako substrat wzrostowy. Był on zdolny, drogą indukcji wtórnej, tolerować cyjanek w stężeniach nie przekraczających 1 mM z równoczesnym rozkładem fenolu. Mogłoby to wskazywać na kometaboliczny proces usuwania cyjanku przez ten szczep, chociaż rozkład tego związku był słabo widoczny (rys. 2). Informacje zawarte w pracy Knowlesa i Buncha (18) sugerowały rozkład cyjanku przy udziale wieloskładnikowej dioksygenazy, która mogła być podobna do niektórych dioksygenaz atakujących struktury aromatyczne (19). Badania przeprowadzone z użyciem szczepu *P. putida* (11) nie dały podstaw do przypuszczeń o występowaniu wielofunkcyjnej dioksygenazy biorącej udział w rozkładzie fenolu i cyjanku.

W badaniach z użyciem szczepu *Pseudomonas sp.* C1, który był wstępnie indukowany do rozkładu cyjanku, nie uzyskano rozkładu fenolu przez ten szczep (rys. 3A i 3B). Fenol nie stanowił dla tego szczepu źródła węgla i nie mógłby być wykorzystany w procesach wzrostowych.

W kolejnej serii badań podjęto próbę otrzymania mieszanej populacji drobnoustrojów osadu czynnego degradujących cyjanek i fenol w warunkach kometabolizmu. Mieszana populacja wykazywała zdolność równoczesnego rozkładu cyjanku potasu w stężeniu 16 mM i fenolu w stężeniach 1 lub 2 mM (rys. 4). Z populacji tej jeden z wyizolowanych szczepów, oznaczony symbolem FC5, podlegał indukcji do równoczesnego rozkładu cyjanku potasu i fenolu w układzie dwuskładnikowym. Bezpośrednio po izolacji szczep ten wykazywał zdolność do wzrostu i rozkładu fenolu w układzie jednoskładnikowym (rys. 5). Rozkładał również cyjanek bezwzrostowo. Posiadał także krótkotwłą zdolność rozkładu cyjanku i fenolu w układzie dwuskładnikowym. Mogłoby się zatem wydawać, że degradacja obu tych związków odbywa się w procesie kometabolizmu. Jednak utrata zdolności degradacji fenolu przez ten szczep, po dłuższym kontakcie z cyjankiem, nakazuje zachowanie dużej ostrożności w interpretowaniu tego zjawiska. Obecność cyjanku może powodować kompleksowanie żelaza i obniżanie dostępności tych jonów w procesach biosyntezy, np. dioksygenaz katecholowych, które zawierają żelazo w swojej strukturze.

4. Wnioski

Z przeprowadzonych badań wynika, że pojedynczy szczep bakterii rodzaju *Pseudomonas* nie może trwale przystosować się do równoczesnej degradacji fenolu i cyjanku. U różnych szczepów tego rodzaju proces ten może przebiegać poprzez odmienne mechanizmy biodegradacyjne.

Uzyskane obserwacje nie potwierdzają sugestii teoretycznych, że występuje pewna analogia w układach enzymatycznych atakujących cyjanek i rozrywających struktury aromatyczne (18). W obecności cyjanku kompleksującego jony żelaza, mogą ulegać zahamowaniu aktywności dioksygenaz katecholowych rozkładających struktury aromatyczne. Z tego punktu widzenia interesujące jest, że równoczesny proces degradacji cyjanku i fenolu można trwale osiągnąć w warunkach mieszanej populacji drobnoustrojów, a także właściwie prowadzonego procesu adaptacyjnego. Sugeruje to, że każdy z tych związków ulega degradacji z udziałem innych drobnoustrojów. Niektóre z nich posiadają zdolność pobierania jonów żelaza potrzebnego do syntezy dioksygenaz nawet w warunkach deficytu żelaza spowodowanego przez kompleksowanie tego jonu przez cyjanek.

Literatura

1. Horvath R. S., Alexander M., (1970), *Appl. Microbiol.*, 20, 254–262.
2. Jacobson S. N., Omara N. L., Alexander M., (1980), *Appl. Environ. Microbiol.*, 40, 917–920.
3. Alexander M., (1981), *Science*, 211, 132–138.
4. Grant W. D., Long P. E., (1986), "Environmental microbiology" in: "The handbook of environmental chemistry", Pringer-Verlag, Berlin, vol.1, part D.
5. Schiaris M. P., Cooney J. J., (1983), *Appl. Environ. Microbiol.*, 43, 706–712.
6. Dagley S., (1971), *Adv. Microbiol. Physiol.*, 6, 1–22.
7. Knowles C. J., (1976), *Bact. Rev.*, 40, 652–660.
8. Pawlikowska C., Chmielowski J., Sikora M., (1985), *Acta Biol. Sil.*, 18, 79–84.
9. Pawlikowska C., (1985), rozprawa doktorska, UŚl., Katowice.
10. Chmielowski J., Kłapcińska B., Łabużek S., (1975), *Pol. Arch. Hydrobiol.*, 22, 327–336.
11. Mrozowska J., (1976), informacja prywatna.
12. Kojima Y., Itada N., Hayaishi O., (1961), *J. Biol. Chem.*, 193, 265–276.
13. Łurie J., Rybnikowa A.J., (1970), „Chimicheskij analiz proizvodstwiennyh stocznych wod”, Gozchi-moizdat, Moskwa.
14. Asmus E., Garshagen H., (1953), *Z. Anal. Chem.*, 138, 414–421.
15. Engelbrecht R. S., McKinney R. E., (1956), *Sew. Ind. Wastes*, 28, 32–38.
16. Łabużek S., (1988), rozprawa habilitacyjna, Wyd. UŚl., Katowice.
17. Hulbert M. H., Krawiec S., (1977), *Theor. Biol.*, 69, 287–292.
18. Knowles C. J., Bunch A. W., (1986), *Adv. Microbiol. Physiol.*, 27, 73–80.
19. Yeh W. K., Gibson D. T., Te-Ning-Liu, (1977), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 78, 401–404.

Degradation of phenol and potassium cyanide by *Pseudomonas* sp. strains

Summary

The biodegradation of phenol in the presence of potassium cyanide by some *Pseudomonas* bacteria was investigated. Phenol was used as a source of carbon and energy and cyanide as a cometabolite.

It was proved that different strains of *Pseudomonas* were able to simultaneous degradation of phenol and cyanide in a confined degree, depending on the way of adaptation to these substrates.

Adres dla korespondencji:

Sylvia Łabużek, Katedra Biochemii, Uniwersytet Śląski, ul. Jagiellońska 28, 40–032 Katowice.