



Biodegradacyjna i bioadsorpcyjna aktywność bakterii z rodzaju *Ochrobactrum* i możliwość jej wykorzystania w bioremediacji środowiska naturalnego

Mateusz Poddębniak, Sylwia Jafra

Zakład Ochrony i Biotechnologii Roślin, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Gdański i Akademia Medyczna, Gdańsk

Ability for biodegradation and bioadsorption of the bacteria from *Ochrobactrum* genus important in bioremediation

Summary

Bacteria from *Ochrobactrum* genus are found in various environments. They were isolated from soil, sewage, plant tissue and human body, where they acted as a human opportunistic pathogens. *Ochrobactrum* are able to degrade a wide variety of chemical substances, such as atrazine, nicotine, phenol or polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and accumulate heavy metals. Many of those substances pose a threat to the environment and to mankind. The representatives of this genus also play an important role in the nitrogen cycle as one of the symbiotic bacteria of legume plants that reduce nitrites to atmospheric nitrogen.

There is still little information about the genus *Ochrobactrum* and this is why it is necessary to focus more attention on it in terms of environmental protection.

Key words:

bioremediation, *Ochrobactrum*, environment, biodegradation, pollution.

1. Wprowadzenie

Wraz ze zwiększającym się zagrożeniem dla środowiska i człowieka, jakie stanowi liczba toksycznych odpadów przemysłowych i antropogenicznych rośnie potrzeba doskonalenia metod

Adres do korespondencji

Sylwia Jafra,
Zakład Ochrony
i Biotechnologii Roślin,
Międzyuczelniany Wydział
Biotechnologii,
Uniwersytet Gdański
i Akademia Medyczna,
ul. Kładki 24,
80-822 Gdańsk;
e-mail:
jafra@biotech.ug.gda.pl

ich utylizacji i detoksykacji. Przystarzałe, zwykle mało efektywne techniki składowania i spalania są wypierane przez coraz nowsze metody utylizacji umożliwiające jednocześnie pozyskiwanie energii z odpadów. Pozwalają one ograniczyć ilość zanieczyszczeń wprowadzanych do wód, gruntów i atmosfery oraz przywrócić pierwotny stan zdegradowanego środowiska. Jedną z takich metod jest bioremediacja, czyli wykorzystanie naturalnych, biologicznych procesów do usuwania zanieczyszczeń ze środowiska. Jest ona zarówno ekonomicznie jak i ekologicznie korzystniejsza od konwencjonalnych technik remediacyjnych. Głównymi technikami bioremediacji są fitoremediacja oraz biodegradacja. Pierwsza koncentruje się na zastosowaniu roślin zdolnych do akumulacji lub neutralizacji substancji obcego pochodzenia (ksenobiotyków), w drugiej wykorzystuje się naturalne zdolności bakterii i grzybów do produkcji enzymów rozkładających substancje toksyczne i zakłada wykorzystanie procesów metabolicznych zachodzących w komórkach drobnoustrojów w celu eliminacji zanieczyszczeń (1).

Zaplanowanie efektywnego procesu biodegradacji zanieczyszczeń na określonym obszarze, wymaga analizy szeregu czynników. Dokładne poznanie cech podłoża poddawanego remediacji oraz charakterystyka fizykochemiczna środowiska, może dostarczyć istotnych informacji na temat dostępności zanieczyszczeń dla wprowadzanych mikroorganizmów. Analiza warunków atmosferycznych umożliwia określenie optymalnych parametrów, w jakich zachodzić będą pożądane procesy. Najistotniejszym aspektem jest jednak, identyfikacja zanieczyszczenia oraz dobranie takich zestawów drobnoustrojów, które będą je skutecznie neutralizować (akumulować lub rozkładać) i jednocześnie nie zakłócać wzajemnej produkcji enzymów służących do degradacji ksenobiotyków. W związku z tym, na całym świecie prowadzone są badania, mające na celu pozyskanie mikroorganizmów zdolnych do rozkładu związków szkodliwych, ich identyfikację i klasyfikację.

Bakterie z rodzaju *Ochrobactrum* stosunkowo niedawno włączono do grupy organizmów posiadających zdolność akumulacji i degradacji licznych ksenobiotyków. Rodzaj *Ochrobactrum* należy do rodziny *Brucellaceae* zaliczanej do α -proteobakterii (2). Po raz pierwszy został opisany przez Holmesa i in. (3). Jest on najbliższym spokrewnionym z rodzajem *Brucella*, do którego należy wiele gatunków chorobotwórczych dla ludzi i zwierząt (4). Dotychczas opisano trzynaście różnych gatunków *Ochrobactrum*: *O. anthropi* (3), *O. intermedium* (4), *O. tritici*, *O. grignonense* (5), *O. gallinifacis* (6), *O. lupini* (7), *O. oryzae* (8), *O. cytisi* (9), *O. pseudogrignonense*, *O. haematophilum* (10), *O. pseudointermedium* (11), *O. rhizosphaerae* i *O. thiophenivorans* (12). W 2007 r. zsekwencjonowano genom szczepu *O. anthropii* ATCC 49188 (Project ID: 19485). Na genom szczepu *O. anthropi* ATCC49188 składają się dwa chromosomy (2,9 Mpz i 1,9 Mpz) oraz 4 megaplazmidy (pOANT01, pOANT02, pOANT03, pOANT04). Bakterie z gatunku *O. anthropi* zostały scharakteryzowane jako ludzkie patogeny oportunistyczne, gdyż najczęściej izolowano je od pacjentów z obniżoną odpornością z objawami bakteriemii (8). Podobne pochodzenie i właściwości posiadają opisane w latach 1998-2007 bakterie z gatunków *O. intermedium* (4), *O. pseudointermedium* (11), *O. pseudogrignonense* oraz *O. haematophilum* (10). Również

w ostatnich latach pojawiły się doniesienia o izolacji bakterii z rodzaju *Ochrobactrum* z brodawek roślin bobowatych (dawniej motylkowych) oraz ryżu, w których pełnią istotną rolę w wiązaniu azotu atmosferycznego (7-9). Ponadto, szereg izolatów należących do rodzaju *Ochrobactrum* pozyskano z różnorodnych środowisk (rzeki, kanały i ścieki, gleba uprawna, ryzosfera), często zanieczyszczonych produktami gospodarki ludzkiej (13). Zdolności tych bakterii do zasiedlania zróżnicowanych środowisk, a w szczególności tych o wysokim stopniu zanieczyszczenia ściekami przemysłowymi, pestycydami i herbicydami, wzbudziły zainteresowania badawcze. Podjęto prace nad reakcją tych bakterii na czynniki stresowe, jakimi są zanieczyszczenia oraz nad możliwościami ich potencjalnego wykorzystania w biodegradacji i bioremediacji.

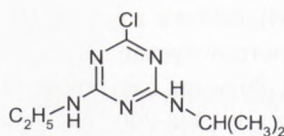
2. Biodegradacja zanieczyszczeń przez *Ochrobactrum* sp. i ich reakcja na związki toksyczne

W latach 1998-2008 opisano 13 gatunków bakterii z rodzaju *Ochrobactrum*, jednak większość badań nad zdolnością do biodegradacji ksenobiotyków z użyciem bakterii z rodzaju *Ochrobactrum* prowadzono z wykorzystaniem 3 najwcześniej opisanych gatunków *O. anthropi* oraz *O. intermedium* i *O. tritici*. Przedstawiamy mechanizmy odpowiedzialne za zdolność do bioremediacji zanieczyszczeń przedstawicieli tych bakterii.

2.1. Enzymy *O. anthropi* biorące udział w degradacji herbicydów i związków fenolowych

Pestycydy i herbicydy są szeroko stosowane jako środki ochrony upraw, jednocześnie powodują skażenia wód gruntowych oraz gleby. *O. anthropi* charakteryzuje się zdolnością do rozkładu wielu związków chemicznych m.in., atrazyny oraz pestycydów fosforoorganicznych (paration, dichlorowos).

Atrazyna (2-chloro-4-etylamino-6-izopropyls-triazyna) (rys. 1) jest herbicydem najczęściej akumulowanym w glebie terenów uprawnych oraz w pobliżu gospodarstw rolnych. W obecności atrazyny fosfolipidowy skład błony komórkowej (stosunek nasyconych do nienasyconych kwasów tłuszczowych) bakterii *O. anthropi* ulega zmianie (14). Zmiana składu kwasów tłuszczowych prowadząca do wzrostu stop-



Rys. 1. Wzór strukturalny cząsteczki atrazyny.

nia nasycenia lipidów błony komórkowej jest jednym z mechanizmów obronnych komórki bakteryjnej przeciwko substancjom błonowo-czynnym, takim jak niektóre rozpuszczalniki organiczne i związki aromatyczne (15). Odpowiedź komórki *O. anthropi* na atrazynę jest reakcją unikatową, gdyż atrazyna, pod względem strukturalnym, nie jest zbliżona do poznanych substancji wpływających na kwasy tłuszczowe zawarte w błonie komórkowej. Dokładny mechanizm rozkładu atrazyny przez bakterie *O. anthropi* nie został do tej pory opisany, jednak w dotychczasowych badaniach wskazuje się, że metabolizm tego herbicydu wiąże się z produkcją i działaniem enzymów: S-transferazy glutationowej (GST) oraz reduktazy sulfotlenku metioniny (MsrA) (16,17).

2.1.1. S-transferaza glutationowa (GST) [EC 2.5.1.18]

Komórki żywe, w odpowiedzi na wzrastające stężenie związków toksycznych, produkują enzymy katalizujące reakcję detoksyfikacji. Reakcja ta obejmuje dwa etapy; pierwszy prowadzony przez system cytochromu P-450; drugi, pośredniczony przez transferazy glutationu katalizujące wiązanie ksenobiotyku z wewnątrzkomórkowym substratem, którym jest glutation (GSH) (18,19). Transferazy glutationowe zaliczane są do rodziny wielofunkcyjnych, dimerycznych białek, które katalizują przyłączanie atomu siarki cząsteczki glutationu do różnych elektrofilowych związków pochodzenia zarówno wewnątrz- jak i zewnątrzkomórkowego. Dobrze poznane są cytoplazmatyczne transferazy glutationowe ssaków, które w wyniku analizy struktury pierwszorzędowej i właściwości immunologicznych zostały pogrupowane w klasy: *alfa*, *mi*, *pi*, *teta*, *omega*, *zeta* i *kappa*. Zdecydowanie słabiej poznane są transferazy glutationowe bakterii (20). Pierwotnie, bakteryjne GST klasyfikowano według podziału przyjętego dla ssaczy GST (20). Obecnie jednak wyróżnia się głównie jedną klasę bakteryjnych GST: klasę *beta* (19). Badacze wskazują także na możliwość istnienia innych bakteryjnych GST, których przykładem jest *teta*-podobna GST występująca w komórkach *O. anthropi* (17).

S-transferaza glutationowa *O. anthropi* (OaGST – GST *O. anthropi*) wykazuje aktywność transferazy wobec takich węglowodorów aromatycznych jak: 1-chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB), chlorek p-nitrobenzylu, tlenek 4-nitrochinoliny, a także aktywność glutationo-zależnej peroksydazy wobec wodoronadtlenku kumenu. W badaniach nad aktywnością OaGST wobec atrazyny wykazano, że enzym ten bierze udział w degradacji tego herbicydu, i prawdopodobnie katalizuje rozkład produktów metabolizmu atrazyny w komórkach *O. anthropi* (16). W dotychczasowych badaniach wykazano, że bakterie z rodzaju *Ochrobactrum*, rozkładają takie związki jak fenol, 4-chlorofenol (4-CP), 2,4-dichlorofenol (DCP) (21). Wymienione, błonowo-czynne związki powodują, zależny od ich stężenia, wzrost ekspresji genu *gst* kodującego S-transferazę glutationową, natomiast w przypadku atrazyny, wzrost ekspresji genu *gst* następuje nawet, gdy występuje ona w niskich, nietoksycznych stę-

zeniach (22). Wykazano, że wzrost ekspresji genu *gst* w komórkach *O. anthropi* wiąże się bezpośrednio z zahamowaniem wzrostu komórek i uszkodzeniem błony komórkowej (wyciek jonów K^+) wywołanym przez związki błonowo-czynne. Potwierdza to hipotezę o zależności pomiędzy aktywnością OaGST a zmianami w stopniu nasycenia lipidów błony komórkowej *O. anthropi* (17). Poziom OaGST w komórkach bakteryjnych nie ulega zmianie pod wpływem nagłych zmian pH, temperatury, ciśnienia osmotycznego, dostępności składników pokarmowych oraz stężenia metali ciężkich lub alkoholi alifatycznych (23). Na podstawie tych obserwacji wskazuje się, że w procesie regulacji odpowiedzi komórki na obecność substancji błonowo-czynnych nie bierze udziału czynnik sigma S (σ^S), globalny regulator odpowiedzi komórki na czynniki stresowe.

2.1.2. Reduktaza sulfotlenku metioniny (MsrA) [EC 1.8.4.11]

Reduktaza sulfotlenku metioniny (MrsA) jest kolejnym, istotnym elementem mechanizmu obronnego komórki przed czynnikami stresowymi (24). W organizmach oddychających tlenem, reaktywne formy tlenu (RFT) są generowane stale. Ksenobiotyki, występujące w środowisku, wywołują stres oksydacyjny objawiający się nadprodukcją RFT, która może powodować bardzo szkodliwe dla komórki zmiany. Stres oksydacyjny powoduje m.in. utlenianie metioninowych reszt wewnątrzkomórkowych białek, co przeważnie prowadzi do utraty biologicznej aktywności tych białek. Reduktaza sulfotlenku metioniny katalizuje redukcję zarówno wolnych jak i związanych z białkami reszt sulfotlenku metioniny do metioniny, przywracając w ten sposób funkcje biologiczne białek (25).

Komórki *O. anthropi* syntetyzują białko MsrA konstytutywnie, co wskazuje na istotną fizjologiczną rolę tego białka. Na podstawie wyników badań sugeruje się, że metionina zawarta w białkach wiąże reaktywne formy tlenu (RFT) ulegając utlenieniu. W kolejnych etapach następuje redukcja utlenionej metioniny przy udziale MsrA i przywrócenie biologicznej aktywności białka.

W komórkach bakterii *O. anthropi* poddanych stresowi oksydacyjnemu za pomocą takich czynników, jak nadtlenek wodoru, nadtlenek wodoru z chlorkiem żelaza czy herbicyd – parakwat, wewnątrzkomórkowy poziom MsrA nie ulega zmianie, co sugeruje, że konstytutywny poziom ekspresji genu kodującego ten enzym, jest wystarczający do obrony komórki przed stresem oksydacyjnym wywołanym przez te związki (23). W odróżnieniu od wymienionych substancji, stres oksydacyjny wywołany przez fenol lub chlorofenol indukuje ekspresję genu *msrA*. Zjawisko to może być związane z oksydacyjnym metabolizmem związków fenolowych, gdyż komórki *O. anthropi* hodowane w pożywce zawierającej katechol (pochodne fenolu), również wykazują wzrost poziomu tego białka (24). Katechol wywołuje wzrost ekspresji genu *msrA* i jednocześnie indukuje tworzenie wolnych rodników, co szkodliwie wpływa na komórkę bakteryjną (24,26-29). *O. anthropi* jest pierwszym opisanym

mikroorganizmem, u którego wewnątrzkomórkowy poziom enzymu MrsA regulowany jest przez związki fenolowe obecne w środowisku. Jednak dla wyjaśnienia tego zjawiska konieczne jest dokładne poznanie mechanizmu „obronnego” *O. anthropi*.

2.2. Udział reduktazy azotanowej wytwarzanej przez *O. anthropi* w degradacji halogenków estrów benzoesowych

Halogenki aromatyczne są powszechnie wykorzystywane w produkcji środków ochrony roślin, rozpuszczalników, a także w przemyśle farmaceutycznym. Związki te działają toksycznie na organizmy żywe, stąd konieczność usuwania halogenków ze środowiska naturalnego. Wiele bakterii denitryfikacyjnych, należących głównie do α -, β - i γ - *Proteobacteria* (30,31), jest zdolnych do degradacji halogenków estrów benzoesowych. Należą do nich m. in. bakterie *O. anthropi*, które w warunkach beztlenowych wykorzystują 2-fluorek estru benzoesowego, 4-fluorek estru benzoesowego lub 3-chlorek estru benzoesowego.

Wiele mikroorganizmów pozyskuje energię w procesach oddychania beztlenowego. Jedną z form takiego oddychania wykorzystywaną przez wiele bakterii jest denitryfikacja. Polega ona na dysymilacyjnej przemianie azotanów(V) lub azotanów(III) do azotu atmosferycznego. W środowisku naturalnym przeprowadzana przez bakterie redukcja azotanów(III) przyczynia się do usuwania toksycznych związków, co zapobiega powstawaniu karcynogenów generowanych przez azotan(III) i aminy. Głównym etapem metabolizmu bakterii zdolnych do denitryfikacji, jest redukcja azotanów(III) polegająca na ich przekształcaniu w gazowy tlenek azotu(II). Reakcja ta pełni istotną funkcję w procesach pozyskiwania energii przez te bakterie, a ponadto jest efektywną metodą usuwania azotu z puli azotu związanego. Reduktaza azotanowa(III) [EC. 1.7.2.1.], enzym katalizujący ten proces, umiejscowiona jest w przestrzeni periplazmatycznej (32) i występuje w dwóch głównych formach: reduktaza azotanowa(III) typu cytochromu cd_1 (NirS) kodowana przez gen *nirS* i reduktaza azotanowa(III) typu miedziowego (NirK) kodowana przez gen *nirK*. Oba enzymy spełniają identyczną funkcję fizjologiczną tzn. przekształcają NO_2^- w NO (33,34).

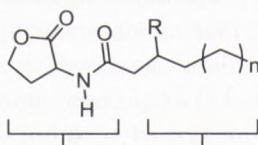
W genomie badanych szczepów *O. anthropi* stwierdzono obecność genu *nirK* kodującego reduktazę azotanową(III) typu miedziowego (30). Obecność w komórkach *O. anthropi* jednego z najważniejszych enzymów uczestniczących w obiegu azotu w przyrodzie utwierdza pozycję tego mikroorganizmu jako istotnego elementu każdego ekosystemu.

2.3. Udział amidaz i innych hydrolaz wytwarzanych przez *O. anthropi* w degradacji amidów, aminokwasów i antybiotyków

Amidazy [EC 3.5.1.4] należą do grupy hydrolaz i oddziałują na wiązania pomiędzy węglem i azotem występujące w liniowych amidach. Bakterie z gatunku *O. anthropi* są zdolne do syntezy amidaz. Asano i in. (35) opisali D-stereospecyficzną amidazę zdolną do hydrolizy D-izomerów amidów aminokwasów o niepodstawionej grupie α -aminowej. Amidaza ta, charakteryzuje się szerokim zakresem hydrolizowanych substratów (amidy-D-aminokwasów). Ponadto, stwierdzono obecność motywu typowego dla β -laktamaz oraz białek wiążących penicylinę w miejscu aktywnym tego enzymu (PBP, ang. *Penicillin Binding Protein*). Kolejnym enzymem, wykrytym w komórkach *O. anthropi*, była L-stereospecyficzna amidaza, którą w 1993 r. scharakteryzowali van den Tweel i in. (36). Enzym ten wykazuje aktywność względem bardzo szerokiego spektrum substratów, do których zaliczają się zarówno amidy α -H- α -alkylo- i *N*-hydroksy- α -aminokwasów, jak i amidy α -hydroksykwasów, czyli ok. 25 różnych rodzajów związków (37,38).

Produkty reakcji przeprowadzanej przez ten enzym znalazły zastosowanie jako składniki leków przeciwwirusowych, przeciwnowotworowych oraz przeciwartretycznych (37). W 2005 r. Patett i Fischer (38) opisali z kolei, amidazę pochodzącą z komórek *O. anthropi* zdolną do odłączania łańcucha kwasu δ -(D- α -aminoadypinowego) od rdzenia cząsteczki cefalosporyny C. Izolacja tego enzymu pozwoliła na uproszczenie i usprawnienie procesu produkcji półsyntetycznych pochodnych tego antybiotyku (38).

Bakterie z rodzaju *Ochrobactrum* wykazują zdolność do enzymatycznej degradacji laktonów *N*-acylo homoseryny (AHL) (rys. 2) (39). AHL reprezentują grupę cząsteczek sygnałowych powszechnie wytwarzanych przez bakterie gramujemne i odgrywających istotną rolę w procesie komunikacji między komórkami bakterii oraz środowiskiem naturalnym poprzez modulację ekspresji określonych genów (39,40). Wiele bakterii glebowych produkuje enzymy degradujące cząsteczki sygnałowe typu AHL (41,42). Opisano, jak dotąd, dwie główne klasy enzymów hydrolizujących AHL: laktonazy AHL – rozszczepiające pierścień laktonowy cząsteczki AHL oraz amidazy AHL odcinające grupę acylową uwalniając lakton homoseryny (41). W prowadzonych do tej pory badaniach wykluczono obecność laktonazy AHL w komórkach *Ochrobactrum* sp. A44 wskazując na obecność amidazy AHL (39).



Rys. 2. Ogólny schemat laktonu acylo-homoseryny (AHL); R – podstawnik łańcucha bocznego.

Poza amidazami znane są także inne hydrolazy wytwarzane w komórkach *O. anthropi*, takie jak aminopeptydazy (43,44), hydantoinazy (45) czy β -laktamazy (46,47). Enzymy te mogą w przyszłości znaleźć zastosowanie w przemyśle lub bioremediacji.

2.4. Bioemulsyfikatory wytwarzane przez bakterie *O. anthropi* istotne w bioremediacji substancji ropopochodnych

Przemysł olejowy i chemiczny przyczynia się do wzrostu zanieczyszczeń środowiska substancjami ropopochodnymi. Wspominano już, że bioremediacja i biodegradacja stanowią efektywne i akceptowalne metody usuwania uciążliwych zanieczyszczeń z gleby i wody. Większość związków węglowodorowych znajdujących się w ropie naftowej oraz produktach jej rafinacji ulega biologicznej degradacji z udziałem mikroorganizmów, stąd ich wykorzystanie, jak się wydaje, jest jak najbardziej pożądane. Dostępność substancji ropopochodnych dla mikroorganizmów je degradujących jest jednak ograniczona przez łatwość wiązania się tych substancji ze składnikami gleby. Dopiero zastosowanie substancji powierzchniowo czynnych pozwala na oddzielenie się substancji olejowych od cząsteczek gleby i pełne wykorzystanie potencjału mikroorganizmów.

W najnowszych badaniach prowadzonych przez Calvo i in. (48) wykazano, że szczep *O. anthropi* AD2 wytwarza zewnątrzkomórkowy polisacharyd (EPS, *Extracellular Polymeric Substances*) o właściwościach powierzchniowo czynnych. W obecności węglowodorów: *n*-octanu oraz lekkiego, ciężkiego lub surowego oleju mineralnego w pożywce z glukozą, szczep AD2 wykazuje wzmogłą produkcję EPS. Obecność ksyleny i toluenu w pożywce hamuje natomiast wzrost szczepu AD2, wskazując na toksyczne działanie tych substancji względem badanego szczepu *O. anthropi*. W pracach Calvo i in. (48) wykazano, że w skład EPS wchodzi oprócz polisacharydów, także białka, a ich ilość determinowana jest rodzajem węglowodorów zawartych w podłożu. Przykładowo, w pożywce wzbogaconej w surowy olej mineralny udział białka w EPS wynosił 32,6%, natomiast w przypadku wzbogacenia pożywki o frakcję lekką oleju mineralnego, zawartość białka w EPS wynosiła 10,8%. Wprowadzenie EPS wytwarzanego przez szczep AD2, wraz z oleofilnym nawozem (nazwa komercyjna S200C), do gleby zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi prowadził do wzrostu liczebności populacji bakteryjnej, a także wpływał na obniżenie ilości węglowodorów w testowanej próbce. Wyniki te wskazują, że obecność EPS pochodzący ze szczepu AD2 w kombinacji z S200C wydajniej uwalniał substancje ropopochodne z cząsteczek gleby. Węglowodory uwolnione z gleby były efektywnie rozkładane przez zasiedlającą daną glebę bakterie, co powodowało ich szybki rozwój i zwiększało skuteczność oczyszczania gleby. Dlatego też, wykorzystanie bakterii zdolnych do syntezy bioemulsyfikatorów w bioremediacji środowisk zanieczyszczonych substancjami olejowymi ma zasadnicze znaczenie.

2.5. Zdolność *O. anthropi* do akumulacji metali ciężkich

Metale ciężkie są jednym z najpoważniejszych zanieczyszczeń powodujących skażenie wód odpadowych i ścieków. Wiele bakterii tworzy aglomeraty zdolne do zatrzymywania dużej ilości metali ciężkich w strukturach ściany komórkowej. Ten pasywny proces, zwany biosorpcją, oparty jest na powinowactwie form metalicznych lub jonowych do miejsc wiązania w strukturze ściany komórkowej (49).

Zdolność akumulacji metali przez bakterie i inne mikroorganizmy została wykorzystana w procesach oczyszczania skażonych metalami ciężkimi wód ściekowych, odpadów kopalnianych i metalurgicznych (50).

Bakterie *O. anthropi* znalazły zastosowanie w procesie oczyszczania ścieków jako komponent osadów czynnych. Komórki *O. anthropi* wytwarzają duże ilości zewnątrzkomórkowego polisacharydu EPS, tworzącego kłaczkowaty śluz, który jest odpowiedzialny za wyłapywanie jonów metali i magazynowania ich w postaci powierzchniowej warstwy adhezyjnej (51). Bakterie *O. anthropi* przeżywiają nawet w środowisku zawierającym 16 mg l^{-1} Cr(VI), 30 mg l^{-1} Cd(II) i 125 mg l^{-1} Cu(II). Zaobserwowano wpływ pH środowiska na zdolność bakterii *O. anthropi* do wiązania jonów metali. Najwyższe wartości adsorpcji ustalono kolejno dla jonów Cr(VI) przy pH 2,0, Cd(II) przy pH 8,0, a Cu(II) pH 3,0. Ustalono ponadto, że kwasowość pożywki wpływa na rozpuszczalność metali i jonizację grup karboksylowych, fosforanowych, czy aminowych związków wchodzących w skład ściany komórkowej *O. anthropi* i EPS. Grupy karboksylowe i fosforanowe ściany komórkowej i EPS posiadają ujemny ładunek, co nadaje im funkcję „zmiataaczy” kationów. W literaturze wskazuje się, że EPS produkowane przez *O. anthropi* biorą udział w wiązaniu metali ze środowiska naturalnego.

Zdolność akumulowania jonów metali ciężkich odgrywa zasadniczą rolę w oczyszczaniu skażonych wód ściekowych i odpadów, aczkolwiek bardziej efektywnym i mniej problematycznym procesem jest redukcja szkodliwych jonów. Bakterie z gatunku *O. anthropi* nie są zdolne do redukcji jonów metali ciężkich, jednakże taką właściwość posiadają inne bakterie z rodzaju *Ochrobactrum*.

2.6. Zdolność *O. tritici* do akumulacji i redukcji metali ciężkich

Branco i in. (52) przedstawili pracę, w której opisali szczep *O. tritici* 5bv11 odporny na Cr(VI), redukujący jony Cr(VI) oraz tolerujący wysokie zasolenie i środowisko zasadowe. Szczep ten, w przeciwieństwie do opisanego przez Leuhn i in. (5), innego szczepu *O. tritici* DSM13341, może degradować celobiozę i β -gentiobiozę oraz jest odporny na polimiksynę B i tetracyklinę. Z reguły mechanizm oporności na te antybiotyki związany jest ze zmianami przepuszczalności błony komórkowej (53).

Badany szczep *O. tritici* 5bv11 przeżywał w środowisku zawierającym jony Cr(VI) w stężeniach sięgających 10 mmol l^{-1} (52 mg l^{-1}). Jest to jedyny, jak dotąd, opisany

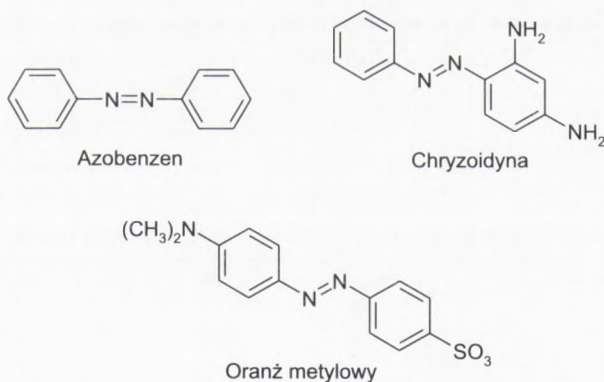
szcep bakteryjny tolerujący tak wysokie zasolenie, środowisko silnie zasadowe oraz wytrzymujący tak wysokie stężenie jonów Cr(VI) (54). Odporność na duże stężenia NaCl umożliwia bakteriom życie w środowiskach, gdzie sól ta jest jednym z czynników indukujących stres. Takie warunki są np. typowe dla wód ściekowych przemysłu garbarskiego.

Omawiany szcep *O. tritici* jest odporny na wysokie stężenia jonów Cr(VI) oraz posiada zdolność do ich redukcji. Jego zdolność do wzrostu w warunkach dużego zasolenia oraz w obecności innych szkodliwych jonów metali czyni go cennym narzędziem do bioremediacji środowisk skażonych metalami ciężkimi (54).

2.7. Degradacja związków azowych (AZO) przez *O. intermedium*

Związki azowe to organiczne związki chemiczne posiadające w swojej strukturze grupę azową ($-N=N-$) (rys. 3). Związki te są częstą przyczyną zanieczyszczeń gleby i wód ściekowych. Związki azowe wykorzystywane są jako barwniki AZO w przemyśle tekstylnym, spożywczym, farmaceutycznym, kosmetycznym i farbiarskim. Ponadto, wykorzystywane są w produkcji pestycydów. Do tej pory przeprowadzono niewiele badań nad mikrobiologiczną transformacją azobenzenów. Większość z nich dotyczyła degradacji barwników AZO (56,57). Biologiczna transformacja związków AZO jest obiecującą metodą remediacji gleby oraz usuwania tych substancji z wody czy ścieków produkcyjnych.

Wackerow-Kouzowa (58) izolowała bakterie ze skażonego *trans*-azobenzenem obszaru pod Sankt Petersburgiem (dawniej Leningradem) w celu znalezienia drobnoustrojów najlepiej przystosowanych do życia w obecności tego ksenobiotyku. Wyizolowane szczepy zidentyfikowano, poprzez analizę genów kodujących 16S rRNA, jako *O. intermedium*. Pierwotnie opisany przez Velasco i in. (4), gatunek bakterii *O. intermedium* swoją nazwę zawdzięcza pośredniej pozycji systematycznej po-



Rys. 3. Wzory strukturalne najczęściej spotykanych związków AZO.

między *O. anthropi* i *Brucella* spp. *O. intermedium* może być oportunistycznym patogenem ludzkim wywołującym bakteremie szpitalne, ale przede wszystkim jest bakterią glebową, często występującą na obszarach zanieczyszczonych.

O. intermedium hodowano w pożywce zawierającej azobenzen, chryzoidynę i oranż metylowy w obecności lub bez glukozy (58). Obserwacja transformacji tych związków była ułatwiona dzięki obecności grupy chromoforowej, która jest odpowiedzialna za ich czerwonawą barwę. Degradacja cząsteczki azobenzenu powoduje rozpad grupy chromoforowej, a to z kolei powoduje utratę barwy. Stwierdzono, że bakterie *O. intermedium* rosną intensywnie w obecności azobenzenu na obu rodzajach pożywki, jednak odbarwienie następuje tylko w pożywce z glukozą. Bakterie rosną również na pożywce pozbawionej jakiegokolwiek źródła węgla, włączając azobenzen. Sugeruje to, że *O. intermedium* są zdolne do przestawienia swojego metabolizmu z heterotrofii na chemoautotrofię. Obecność w pożywce glukozy powoduje powrót do heterotroficznego metabolizmu. Z obserwacji tych wynika, że azobenzen jest degradowany wyłącznie w warunkach metabolizmu heterotroficznego.

Odbarwienie chryzoidyny i oranżu metylowego zachodzi jedynie w obecności glukozy jako podstawowego źródła węgla, co wskazuje na jednoczesny metabolizm badanych substancji i glukozy w warunkach heterotroficznych. Bakterie odbarwiają pożywki z tymi barwnikami tylko częściowo, podczas gdy podłoże z azobenzenem ulega całkowitemu odbarwieniu. Można sądzić, że azobenzen ulega całkowitemu rozkładowi, gdyż jest związkiem o prostej budowie, natomiast związki o bardziej skomplikowanej budowie rozkładane są do produktów przejściowych, które są akumulowane w komórkach *O. intermedium*.

2.8. Degradacja nikotyny przez *O. intermedium*

Nikotyna występująca w tytoniu jest jedną z najczęściej używanych substancji uzależniających na świecie, zażywaną przede wszystkim pod postacią dymu tytoniowego papierosów (59). Alkaloid, jakim jest nikotyna, przyciąga szczególną uwagę, gdyż jest jedną z głównych przyczyn chorób układu krążenia. Przemysł tytoniowy rocznie wytwarza ogromne ilości odpadów, zawierające wysokie stężenie nikotyny (60). Odpady te stanowią potencjalne zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt i są klasyfikowane przez Unię Europejską jako „toksyczne i niebezpieczne”, gdy zawartość nikotyny przekroczy w nich $0,5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ suchej masy (s.m.) (61).

Z uwagi na to, że nikotyna jest toksyczna, dokłada się wielu starań by zmniejszyć jej zawartość w odpadach tytoniowych, co umożliwiłoby ich składowanie jako zwykle odpady miejskie. W porównaniu z fizycznymi i chemicznymi, biologiczne metody degradacji nikotyny są wydajniejsze i tańsze. Nikotyna jest bardzo słabo degradowalnym związkiem i jest toksyczna dla większości mikroorganizmów. Do bakterii posiadających zdolność rozkładania tego związku należą *Pseudomonas putida* i *Cellulomonas* sp. (62), *Enterobacter cloacae* (63) i *Arthrobacter globiformis* (64).

W 2005 r., Yuan i in. (65) wyizolowali z gleby na plantacji tytoniu, bakterie *O. intermedium* zdolne do degradacji nikotyny. Zdolność rozkładu nikotyny przez wyizolowany szczep *O. intermedium* DN2 prowadzono w zoptymalizowanej płynnej pożywce zawierającej różne stężenia nikotyny. Uzyskane wyniki pozwoliły ustalić odpowiednie warunki hodowli oraz określić maksymalne stężenie nikotyny pozwalające na wzrost tych bakterii, a także uzyskać najbardziej optymalne warunki do rozkładu nikotyny. Stwierdzono, że stopień rozkładu nikotyny gwałtownie zwiększał się podczas fazy wzrostu logarymicznego bakterii i po 10 godzinach inkubacji osiągnął poziom 95,55% (ok. 10, mM). Wydajność rozkładu nikotyny przez bakterie *O. intermedium* jest podobna do efektywności działania bakterii *Achromobacter nicotinoaphagum*, ale szybkość tego procesu jest znacznie większa – taka sama ilość nikotyny (ok. 10 mM) w pożywce rozkładana jest w czasie ok. 96 godzin hodowli (66).

Na podstawie analiz spektrofotometrycznych widm mieszaniny zawierającej frakcje błonowe komórek *O. intermedium* oraz nikotyny wykazuje się, że enzymy zaangażowane w degradację nikotyny przez *O. intermedium* zlokalizowane są w pobliżu błony komórkowej, podobnie jak w przypadku enzymów *A. nicotinovorans* (66). Dzięki lokalizacji w pobliżu błony, elektrony pozyskane z degradacji nikotyny mogą być bezpośrednio włączane do łańcucha oddechowego. *A. nicotinovorans* transformuje nikotynę do 2,3,6-trihydroksypirydyny, która w obecności tlenu samoczynnie przechodzi w diazodifenokwinon, związek o niebieskiej barwie. W przypadku *O. intermedium* nie zauważono pojawienia się niebieskiego zabarwienia podczas hodowli bakterii. Z badań tych wynika zatem, że sposób metabolizowania nikotyny w komórkach *O. intermedium* różni się od tego stwierdzonego w komórkach *A. nicotinovorans* (67).

3. Bakterie z rodzaju *Ochrobactrum* jako potencjalne czynniki chorobotwórcze

Bakterie z rodzaju *Ochrobactrum* wyizolowano po raz pierwszy od pacjenta w 1980 r. (3) W literaturze większość przypadków bakteriemii opisano dla gatunku *O. anthropi*, a dopiero w latach 1998-2008 dla innych gatunków *O. intermedium* (4), *O. pseudointermedium* (11), *O. pseudogrignonense* oraz *O. haematophilum* (10). Ponadto, w przeważającej większości infekcje wywoływane bakteriami należącymi do wymienionych gatunków, były spowodowane zanieczyszczeniem sprzętu medycznego – zwłaszcza wenflonów, drenów i cewników, i dotyczyły pacjentów z obniżoną odpornością (z chorobami nowotworowymi, po przeszczepach oraz dializowanych). Do tej pory opisano niewielką liczbę (19) przypadków wystąpienia infekcji bakteriami *O. anthropi* u ludzi o prawidłowo funkcjonującym układzie odpornościowym (68). Wszystkie przypadki infekcji tymi bakteriami zostały skutecznie wyleczone. W przypadku pozostałych gatunków potencjalnie chorobotwórczych, liczba opisanych przypadków jest bardzo niewielka (68). Klasyfikacja bakterii z rodzaju *Ochrobactrum* nastęrcza szereg trudności. Większość dostępnych komercyjnych testów identyfika-

cyjnych (np. API) i baz danych kwalifikuje bakterie z tego rodzaju do gatunku *O. anthropi*. Dopiero bardzo szczegółowe analizy porównawcze obejmujące sekwencjonowanie długich fragmentów regionu kodującego 16S rRNA, badanie polimorfizmu genu *recA*, profilu kwasów tłuszczowych oraz hybrydyzację DNA-DNA genomów pozwalają na prawidłową klasyfikację gatunkową (68).

Wprawdzie, bakterie należące do wymienionych gatunków uznane zostały za oportunistyczne patogeny człowieka o wzrastającym znaczeniu, jednak ich zdolność do wywoływania infekcji uważana jest za niewielką.

4. Podsumowanie

Wdrażanie nowoczesnych technik ochrony i regeneracji zanieczyszczonego środowiska to obecnie najlepsze rozwiązanie problemu narastającej jego dewastacji. Społeczeństwo stosunkowo niedawno zorientowało się, jak ogromnym problemem dla przyszłych pokoleń może stać się szybko postępujące zniszczenie środowiska naturalnego. Raporty Europejskiej Agencji ds. Środowiska (European Environment Agency) przedstawiają wciąż niepokojące dane o emisji szkodliwych substancji do wód, gruntów i powietrza. Stworzenie baz danych zawierających informacje o organizmach posiadających zdolność do degradacji związków szkodliwych oraz o warunkach, w których najefektywniej zachodzą te procesy, jest kluczem do kontrolowanej i wydajnej bioremediacji. Praca ta miała na celu przedstawienie aktualnych informacji i dostępnych danych dotyczących zdolności bakterii z rodzaju *Ochrobactrum* do biodegradacji związków toksycznych oraz możliwości zastosowania tych bakterii w bioremediacji środowiska naturalnego (tab.).

Tabela

Właściwości degradacyjne i akumulacyjne bakterii z rodzaju *Ochrobactrum*

Gatunek bakterii	Utylizowany związek chemiczny	Mechanizm utylizacji	Literatura
1	2	3	4
<i>O. anthropi</i>	atrazyna i inne herbicydy	detoksyfikacja – udział transferazy glutationowej (GST) i reduktazy sulfotlenku metioniny (MrsA)	(16,17)
	halogenki estrów benzoesowych, azotyny	redukcja azotynów – udział reduktaz azotynowych (NirK, NirS)	(30,31)
	degradacja cząstek sygnałowych AHL	degradacja enzymatyczna. Brak aktywności laktonazy AHL, prawdopodobnie efekt działania amidazy AHL	(39)
	aminokwasy, amidy, antybiotyki	aktywność amidaz, hydatoinaz, β -laktamaz	(35-38)
	jony metali ciężkich	akumulacja – udział EPS	(51)

1	2	3	4
<i>O. intermedium</i>	nikotyna związki azowe	metabolizm metabolizm	(66-68) (58)
<i>O. tritici</i>	jony metali ciężkich	akumulacja i redukcja	(54,55)

Praca finansowana w ramach grantu BW/B051-5-0310-8

Autorzy dziękują prof. E. Łojkowskiej i dr A. Gwizdek-Wiśniewskiej za pomoc w redagowaniu tej pracy.

Literatura

- Klimiuk E., Łebkowska M., (2004), Wyd. Nauk. PWN.
- Leal-Klevezas D. S., Martínez-de-la-Vega O., Ramírez-Barba E. J., Osterman B., Martínez-Soriano J. P., Simpson J., (2005), *J. Bacteriol.*, 187, 2537-2539.
- Holmes B., Popoff M., Kiredjian M., Kersters K., (1988), *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 38, 406-416.
- Velasco J., Romero C., López-Goni I., Leiva J., Diaz R., Moiron I., (1998), *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48, 759-768.
- Lebuhn M., Achouak W., Schloter M., Berge O., Meier H., Barakat M., Hartmann A., Heulin T. (2000), *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50, 2207-2223.
- Kaempfer P., Buczolits S., Albrecht A., Busse H. J., Stackebrandt E., (2003), *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53, 893-896.
- Trujillo M. E., Willems A., Abril A., Planchuelo A. M., Rivas R., Ludena D., Mateos P. F., Martínez-Molina E., Velázquez E., (2004), *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 1318-1327.
- Tripathi A. K., Verma S. C., Chowdhury S. P., Lebuhn M., Gattinger A., Schloter M., (2006), *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56, 1677-1680.
- Zurdo-Piñero J. L., Rivas R., Trujillo M. E., Vizcaino N., Carrasco J. A., Chamber M., Palomares A., Mateos P. F., Martínez-Molina E., Velázquez E., (2007), *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57, 784-788.
- Kämpfer P., Scholz H. C., Huber B., Falsen E., Busse H. J., (2007), *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57, 2513-2518.
- Teyssier C., Marchandin H., Jean-Pierre H., Masnou A., Dusart G., Jumas-Bilak E., (2007), *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57, 1007-1013.
- Kämpfer P., Sessitsch A., Schloter M., Huber B., Busse H. J., Scholz H. C., (2008), *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58, 1426-1431.
- Berg G., Eberl L., Hartmann A., (2005), *Environ. Microbiol.*, 7, 1673-1685.
- Laura D., de Socio G., Frassanito R., Rotilio D., (1996), *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 2644-2646.
- Heipieper H.-J., Diefenbach R., Kewelow H., (1992), *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 1847-1852.
- Favaloro B., Melino S., Petruzzelli R., di Ilio C., Rotilio D., (1998), *FEMS Microbiol. Lett.*, 160, 81-86.
- Favaloro B., Tamburro A., Angelucci S., de Luca A., Melino S., di Ilio C., Rotilio D., (1998), *Biochem. J.*, 335, 573-579.
- Wójcik P., Tomaszewska B., (2005), *Biotechnologia*, 4 (71), 156-172.
- Sheehan D., Meade G., Foley V. M., Dowd C. A., (2001), *Biochem. J.*, 360, 1-16.
- Rossjohn J., Polekhina G., Feil S. C., Allocati N., Masulli M., di Ilio C., Parker M. W., (1998), *Structure*, 6, 721-734.
- Müller R. H., Jorks S., Kleinstüber S., Babel W., (1998), *Basic Microbiol.*, 38, 269-281.
- Favaloro B., Tamburro A., Trofino M. A., Bologna L., Rotilio D., Heipieper H. J., (2000), *Biochem. J.*, 346, 553-559.
- Hengge-Aronis R., (1996), *Mol. Microbiol.*, 21, 887-893.
- Tamburro A., Allocati N., Masulli M., Rotilio D., di Ilio C., Favaloro B., (2001), *Biochem. J.*, 360, 675-681.

25. Moskovitz J., Rahman A. T., Strassman J., Yanacey S. O., Kushner S. R., Brot N., Weissbach H., (1995), *J. Bacteriol.*, 177, 502-507.
26. Moskovitz J., Berlett B. S., Poston M., Stadtman E. R., (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 9585-9589.
27. Rushmore T. H., Morton M. R., Pickett C. B., (1991), *J. Biol. Chem.*, 266, 11632-11639.
28. Tamburro A., Robuffo I., Heipieper H. J., Allocati N., Rotilio D., di Ilio C., Favaloro B., (2004), *FEMS Microbiol. Lett.*, 241, 151-156.
29. Prestera T., Holtzclaw W. D., Zhang Y., Talalay P., (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 2965-2969.
30. Song B., Palleroni N. J., Häggblom M. M., (2000), *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 3446-3453.
31. Song B., Ward B. B., (2003), *FEMS Microbiol. Ecol.*, 43, 349-357.
32. Berks B.C., Ferguson S. J., Moir J. W. B., Richardson D. J., (1995), *Biophys. Acta*, 1232, 97-173.
33. Winkler J., Eltis L. D., Dwyer D. F., Rohde M., (1995), *Arch. Microbiol.*, 163, 65-69.
34. Zumft W. G., (1997), *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 61, 533-616.
35. Asano Y., Mori T., Hanamoto S., Kato Y., Nakazawa A., (1989), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 162, 470-474.
36. van den Tweel W. J. J., van Dooren T. J. G. M., de Jonge P. H., Kaptein B., Duchateau A. L. L., Kamphuis J., (1993), *Appl. Microbiol. Biotech.*, 39, 296-300.
37. Sonke T., Ernste S., Tandler R. F., Kaptein B., Peeters W. P., van Assema F. B., Wubbolts M. G., Schoemaker H. E., (2005), *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 7961-7973.
38. Patett F., Fischer L., (2005), *Biotech. Lett.*, 27, 1915-1919.
39. Jafra S., Przysowa J., Czajkowski R., Michta A., Garbeva P., van der Wolf J. M., (2006), *Can. J. Microbiol.*, 52, 1006-1015.
40. Fuqua W. C., Winans S. C., Greenberg E. P., (1994), *J. Bacteriol.*, 176, 269-275.
41. Dong Y. H., Zhang L. H., (2005), *J. Microbiol.*, 43, 101-109.
42. Czajkowski R., Jafra S., (2006), *Biotechnologia*, 2 (73), 49-64.
43. Asano Y., Nakazawa A., Kato Y., Kondo K., (1989), *J. Biol. Chem.*, 264, 14233-14239.
44. Fanel L., Thamm I., Kostanjevecki V., Samyn B., Joris B., Goffin C., Brannigan J., van Beeumen J., Frere J. M., (1999), *Cell Mol. Life Sci.*, 55, 812-818.
45. Pozo C., Rodelas B., de la Escalera S., González-López J., (2002), *J. Appl. Microbiol.*, 92, 1028-1034.
46. Higgins C. S., Avison M. B., Jamieson L., Simm A. M., Bennett P. M., Walsh T. R., (2001), *J. Antimicrob. Chemother.*, 47, 745-754.
47. Nadjar D., Labia R., Cerceau C., Bizet C., Philippon A., Arlet G., (2001), *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45, 2324-2330.
48. Calvo C., Silva-Casto G. A., Uad L., Garcia Fandiño C., Laguna J., González-López J., (2008), *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, DOI 10.1007/s10295-008-0451-1.
49. Manriquez R. A., Magana P. I., Lopez V., Guzman R., (1997), *Bioprocess Eng.*, 18, 113-118.
50. Gadd G. M., (1996), *Endeavor*, 20, 150-156.
51. Ozdemir G., Ozturk T., Ceyhan N., Isler R., Cosar T., (2003), *Bioresource Technol.*, 90, 71-74.
52. Branco R., Alpoim M. C., Morais P. V., (2004), *Can. J. Microbiol.*, 50, 697-703.
53. Bruins M. R., Kapil S., Oehme E. W., (2000), *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 47, 105-111.
54. McArthur J. V., Tuckfield R. C., (2000), *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 3722-3726.
55. Horikoshi K., (1999), *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63, 735-750.
56. Kludich M., Bishop P. L., Knackmuss H. J., Stolz A., (1996), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 46, 597-603.
57. Banat I. M., Nigam P., Singh D., Marchant R., (1996), *Bioresource Technol.*, 58, 217-227.
58. Wackerow-Kouzowa N. D., (2004), *Appl. Biochem. Microbiol.*, 41, 162-164.
59. Dani J. A., Ji D., Zhou F. M., (2001), *Neuron*, 31, 349-352.
60. Hawkins B. T., Abbruscato T. J., Egleton R. D., Brown R. C., Huber J. D., Campos C. R., Davis T. P., (2004), *Brain Research*, 1027, 48-58.
61. Briški F., Horgas N., Vuković M., Gomzi Z., (2003), *Clean Technol. Environ. Policy*, 5, 295-301.
62. Gravely L. E., Lawrence E., Geiss V. L., Vernon L., Charles F., (1978), US Patent No. 4557280.
63. Ruiz G., (1983), *Degrader (Spain)*, 22, 85-98.
64. Schenk S., Hoelz A., Krauss B., Decker K., (1998), *J. Mol. Biol.*, 284, 1323-1339.

65. Yuan Y. J., Lu Z. X., Wu N., Huang L. J., Lü F. X., Bie X. M., (2005), Intl. Biodet. Biodegrad., 56, 45-50.
66. Hylin J. W., (1958), J. Bacteriol., 76, 36-40.
67. Freudenberg W., König K., Andreesen J. R., (1988), FEMS Microbiol. Lett., 52, 13-17.
68. Kampfer Peter, Citron, Diane M., Goldstein, Ellie J. C., Scholz, Holger C., (2007), J. Med. Microbiol., 56, 1571-1573.