

**Zmiany w składzie  
bakteryjnych kwasów tłuszczowych  
w czasie rozkładu fenolu w glebie**

PRACE  
NAUKOWE



UNIWERSYTETU  
ŚLĄSKIEGO  
W KATOWICACH

NR 2689

Agnieszka Mrozik

**Zmiany w składzie  
bakteryjnych kwasów tłuszczowych  
w czasie rozkładu fenolu w glebie**



Redaktor serii: Biologia  
Iwona Szarejko

Recenzenci  
Wiesław Barabasz, Jerzy Długoński

Na okładce: Bakterie w obrazie skaningowego mikroskopu elektronowego (fot. Jagna Karcz)

## Spis treści

|   |    |
|---|----|
| Wykaz skrótów . . . . .   | 7  |
| 1. Wstęp . . . . .  | 9  |
| 1.1. Ogólna charakterystyka fenolu . . . . .  | 9  |
| 1.2. Toksyczność fenolu . . . . .   | 9  |
| 1.3. Rozkład fenolu przez bakterie w warunkach tlenowych . . . . .  | 10 |
| 1.4. Bakteryjne kwasy tłuszczowe. . . . .   | 12 |
| 1.5. Kwasy tłuszczowe jako biomarkery . . . . .   | 14 |
| 1.6. Wpływ związków aromatycznych na błony bakteryjne . . . . .   | 15 |
| 1.7. Mechanizmy regulacji płynności błony bakterii w obecności związków aromatycznych . . . . .   | 16 |
| 1.8. Rozkład związków aromatycznych w glebie . . . . .  | 17 |
| 1.9. Bioaugmentacja a rozkład związków aromatycznych w glebie . . . . .   | 19 |
| 1.10. FAMES w badaniach środowiskowych . . . . .  | 21 |
| 2. Cel pracy . . . . .  | 23 |
| 3. Materiały i metody. . . . .  | 24 |
| 3.1. Szczepy bakteryjne . . . . .   | 24 |
| 3.2. Gleby . . . . .  | 24 |
| 3.3. Wprowadzanie bakterii do gleb . . . . .  | 25 |
| 3.4. Metody analityczne . . . . .   | 25 |
| 3.4.1. Ekstrakcja i oznaczanie fenolu . . . . .   | 25 |
| 3.4.2. Oznaczanie zawartości materii organicznej, węgla organicznego, wilgotności, frakcji kwasów próchnicowych i pH . . . . .  | 25 |
| 3.5. Analizy mikrobiologiczne. . . . .  | 25 |
| 3.5.1. Oznaczanie liczebności bakterii . . . . .  | 25 |
| 3.5.2. Izolacja i identyfikacja kwasów tłuszczowych z komórek bakterii oraz z gleby . . . . .   | 28 |
| 3.6. Analiza statystyczna . . . . .   | 28 |
| 4. Wyniki badań . . . . .   | 29 |
| 4.1. Wprowadzenie bakterii do gleb sterylnych . . . . .   | 29 |
| 4.1.1. Rozkład fenolu w glebach przez szczep <i>Pseudomonas vesicularis</i> . . . . .   | 29 |
| 4.1.2. Przeżywalność szczepu <i>Pseudomonas vesicularis</i> po wprowadzeniu do gleb . . . . .   | 29 |
| 4.1.3. Zawartość materii organicznej, węgla organicznego, frakcji kwasów próchnicowych oraz pH w glebach z wprowadzonym szczepem <i>Pseudomonas vesicularis</i> . . . . . | 31 |
| 4.1.4. Analiza kwasów tłuszczowych szczepu <i>Pseudomonas vesicularis</i> w czasie rozkładu fenolu w glebach . . . . .  | 33 |
| 4.1.5. Rozkład fenolu w glebach przez szczep <i>Pseudomonas</i> sp. JS150 . . . . .   | 40 |
| 4.1.6. Przeżywalność szczepu <i>Pseudomonas</i> sp. JS150 po wprowadzeniu do gleb . . . . .   | 44 |
| 4.1.7. Zawartość materii organicznej, węgla organicznego, frakcji kwasów próchnicowych oraz pH w glebach z wprowadzonym szczepem <i>Pseudomonas</i> sp. JS150 . . . . .   | 44 |

|         |   |     |
|---------|---|-----|
| 4.1.8.  | Analiza kwasów tłuszczowych szczepu <i>Pseudomonas</i> sp. JS150 w czasie rozkładu fenolu w glebach . . . . .   | 44  |
| 4.1.9.  | Rozkład fenolu w glebach przez mieszaninę szczepów <i>Pseudomonas vesicularis</i> i <i>Pseudomonas</i> sp. JS150 . . . . .  | 54  |
| 4.1.10. | Przeżywalność szczepów <i>Pseudomonas vesicularis</i> i <i>Pseudomonas</i> sp. JS150 po wprowadzeniu do gleb . . . . .  | 54  |
| 4.1.11. | Zawartość materii organicznej, węgla organicznego, frakcji kwasów próchnicowych oraz pH w glebach z wprowadzoną mieszaniną szczepów <i>Pseudomonas vesicularis</i> i <i>Pseudomonas</i> sp. JS150 . . . . . | 54  |
| 4.1.12. | Analiza kwasów tłuszczowych w czasie rozkładu fenolu w glebach przez mieszaninę szczepów <i>Pseudomonas vesicularis</i> i <i>Pseudomonas</i> sp. JS150 . . . . .  | 59  |
| 4.2.    | Wprowadzenie bakterii do gleb niesterylnych. . . . .  | 66  |
| 4.2.1.  | Rozkład fenolu w glebach poddanych bioaugmentacji z użyciem mieszaniny szczepów <i>Pseudomonas vesicularis</i> i <i>Pseudomonas</i> sp. JS150 . . . . .   | 66  |
| 4.2.2.  | Wpływ fenolu na przeżywalność mikroorganizmów w glebach poddanych bioaugmentacji . . . . .  | 66  |
| 4.2.3.  | Zawartość materii organicznej, węgla organicznego, frakcji kwasów próchnicowych oraz pH w glebach poddanych bioaugmentacji . . . . .  | 69  |
| 4.2.4.  | Analiza kwasów tłuszczowych w czasie rozkładu fenolu w glebach poddanych bioaugmentacji . . . . .   | 69  |
| 5.      | Dyskusja . . . . .  | 79  |
| 5.1.    | Degradacja fenolu przez bakterie w badanych glebach . . . . .   | 79  |
| 5.2.    | Bioaugmentacja jako metoda wspomagająca rozkład fenolu w glebie . . . . .   | 83  |
| 5.3.    | Wykorzystanie analizy FAMES do monitorowania tempa rozkładu fenolu w glebie . . . . .   | 87  |
| 6.      | Ogólne wnioski . . . . .  | 94  |
|         | Literatura . . . . .  | 95  |
|         | Summary . . . . .   | 105 |
|         | Zusammenfassung . . . . .   | 106 |

# 1. Wstęp

## 1.1. Ogólna charakterystyka fenolu

Fenol (hydroksybenzen, nr CAS 108-95-2) pod względem budowy chemicznej jest najprostszym przedstawicielem jednopierścieniowych węglodorów aromatycznych. Ma grupę hydroksylową –OH, połączoną z węglem pierścienia aromatycznego o hybrydyzacji  $sp^2$ . W stanie czystym występuje pod postacią ciała stałego, krystalicznego, jest bezbarwny. Po utlenieniu przyjmuje natomiast zabarwienie różowe lub brunatne. Charakteryzuje się ostrym, słodkawym zapachem, dobrą rozpuszczalnością w rozpuszczalnikach organicznych (alkoholu etylowym, eterze etylowym, chloroformie, benzynie) oraz — w podwyższonej temperaturze — w wodzie. Jest słabym kwasem, a jego postać jonowa łatwo ulega reakcjom elektrofilowej substytucji i oksydacji (POŚNIAK, 1999; JAKUBOWSKI, 2003). Wybrane właściwości fizykochemiczne fenolu przedstawia tabela 1.

Tabela 1  
Właściwości fizykochemiczne fenolu (POŚNIAK, 1999;  
JAKUBOWSKI, 2003)

| Fenol   | Właściwości |
|---|-------------|
| Wzór sumaryczny                                       | $C_6H_5OH$  |
| Masa molowa, $g\ mol^{-1}$                            | 94,11       |
| Temperatura topnienia, $^{\circ}C$                    | 40,90       |
| Temperatura wrzenia, $^{\circ}C$                      | 181,75      |
| Rozpuszczalność w wodzie, $g\ l^{-1}$ w $25^{\circ}C$ | 87          |
| Gęstość w $20^{\circ}C$ , $g\ cm^{-3}$                | 1,07        |
| Prężność par w $20^{\circ}C$ , mmHg                   | 0,357       |
| Temperatura zapłonu, $^{\circ}C$                      | 75          |
| Kwasowość, $pK_a$                                     | 9,55        |

Fenol i jego pochodne są szeroko rozpowszechnione w środowisku. Naturalnie powstają podczas biodegradacji polimerów zawierających pierścienie

aromatyczne, jak ligniny i taniny. Wchodzą w skład wydzielin korzeniowych roślin (kwas 4-hydroksybenzoesowy, ferulowy, *p*-kumarowy, cynamonowy, syrynginowy i wanilinowy), są też składnikami barwników kwiatów i owoców (SPARLING i in., 1981). Głównym jednak ich źródłem jest przemysł i działalność rolnicza (WISE, KUSKE, 2000). Związki fenolowe (fenol i krezole) powstają podczas koksowania węgla kamiennego i są głównymi składnikami uzyskiwanej w tym procesie smoły pogazowej. Uwalniane są także ze ściekami przemysłowymi, między innymi z koksowni, zakładów przemysłu chemicznego, petrochemicznego, farmaceutycznego, papierniczego i tekstylnego (SWOBODA-COLBERG, 1995; WHITELEY, BAILEY, 2000; ARUTCHELVAN i in., 2003).

Związki fenolowe od lat znajdowały zastosowanie zarówno w celach leczniczych, jak też jako przyprawy, używki, garbniki, trucizny w trakcie polowań i środki halucynogenne. Obecnie produkuje się je na skalę przemysłową i używa jako dodatków do rozpuszczalników organicznych, substancji antyseptycznych, leków (salicylanów), detergentów, farb i lakierów, materiałów przeciwkorozyjnych, żywic syntetycznych (bakelitu), środków wybuchowych (kwasu pikrynowego), biocydów, materiałów fotograficznych oraz tuszu (NEMEROW, 1978; BUDA-VARI, 1996).

## 1.2. Toksyczność fenolu

Fenol należy do silnych trucizn. Działa porażająco na układ nerwowy i krążeniowy. Uszkadza drogi oddechowe, powoduje denaturację białek oraz nekrozę i łuszczenie skóry. Może wywoływać: methemoglobinemię (sinicę), zakwaszenie ustroju

(kwasicę), uszkodzenie nerek (mocznicę) i wątroby (żółtaczkę) (Hazardous Substances Data Bank, 1997; California Environmental Protection Agency, 2003; JAKUBOWSKI, 2003).

Według wykazu substancji niebezpiecznych Centralnego Instytutu Ochrony Pracy w Polsce oraz drugiego wykazu Komisji Europejskiej (Dyrektywa o substancjach toksycznych), fenol jest substancją toksyczną oraz żrącą, ale nie jest sklasyfikowany jako mutageny i rakotwórczy dla ludzi. Dopuszczalne (alarmowe) stężenia fenolu w powietrzu są nieustalone, natomiast określone są dla klas wód powierzchniowych (np. w przypadku I klasy czystości wód indeks fenolowy wynosi 0,001 mg l<sup>-1</sup> przy pH 6,5—8,5, a dla klasy V — 0,05 mg l<sup>-1</sup> przy pH < 5,5 lub > 9,0) oraz dla oczyszczonych ścieków przemysłowych ze wszystkich sektorów (indeks fenolowy wynosi 0,1 mg l<sup>-1</sup>) (Dz.U. 2004, nr 168, poz. 1763). Dopuszczalne stężenie fenolu w glebie wynosi 100 mg kg<sup>-1</sup> s.m. gleby i dotyczy terenów uprzemysłowionych, użytków kopalnych oraz terenów komunikacyjnych (Dz.U. 2002, nr 165, poz. 1359).

Powszechnie używanym wskaźnikiem toksyczności związków chemicznych jest wartość LD<sub>50</sub>, określająca dawkę związku, przy którym ginie 50% badanej populacji. Stopień toksyczności związku koresponduje z jego logP, gdzie P oznacza współczynnik podziału danego związku w układzie oktanol—woda. Spośród związków aromatycznych najbardziej toksyczne są te, których logP mieści się w przedziale 1—5, natomiast te, których logP jest < 1 lub > 5, są mniej toksyczne (HEIPIEPER i in., 1994; SIKKEMA i in., 1995). Wartość logP dla fenolu wynosi 1,45, a LD<sub>50</sub> na przykład dla bakterii

*Pseudomonas putida* — 7,94 mM, z kolei dla *E. coli* > 10,64 mM. Hydrofobowość i toksyczność fenolu w porównaniu z innymi związkami organicznymi ilustruje tabela 2.

### 1.3. Rozkład fenolu przez bakterie w warunkach tlenowych

Z powodu zagrażających środowisku właściwości związków fenolowych zachodzi konieczność ich detoksykacji. Jednym ze skutecznych sposobów eliminacji tych związków jest ich całkowity rozkład przez mikroorganizmy do CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O lub do produktów mniej toksycznych bądź całkowicie nietoksycznych. Mikroorganizmy charakteryzują się wyjątkową, w porównaniu z innymi organizmami, zdolnością adaptacji do nowych warunków środowiska i wykorzystania związków niebędących produktami ich własnych przemian metabolicznych jako substratów energetycznych i budulcowych (CHANG i in., 1997; KANALY, HARAYAMA, 2000; KIM i in., 2002; GOSWAMI i in., 2005; KHLEIFAT, 2006; PŁAZA i in., 2007).

Spośród węglowodorów jednopierścieniowych fenol jest jednym z bardziej podatnych na rozkład przez bakterie. Wynika to z jego prostej budowy (jeden pierścień aromatyczny i jeden podstawnik hydroksylowy) oraz ze stosunkowo dobrej rozpuszczalności w wodzie (tabela 1). Do znanych i opisanych w literaturze szczepów bakterii wykorzystujących go jako źródło węgla i energii należą: *Pseudomonas* sp. CF600, *Pseudomonas stutzeri*

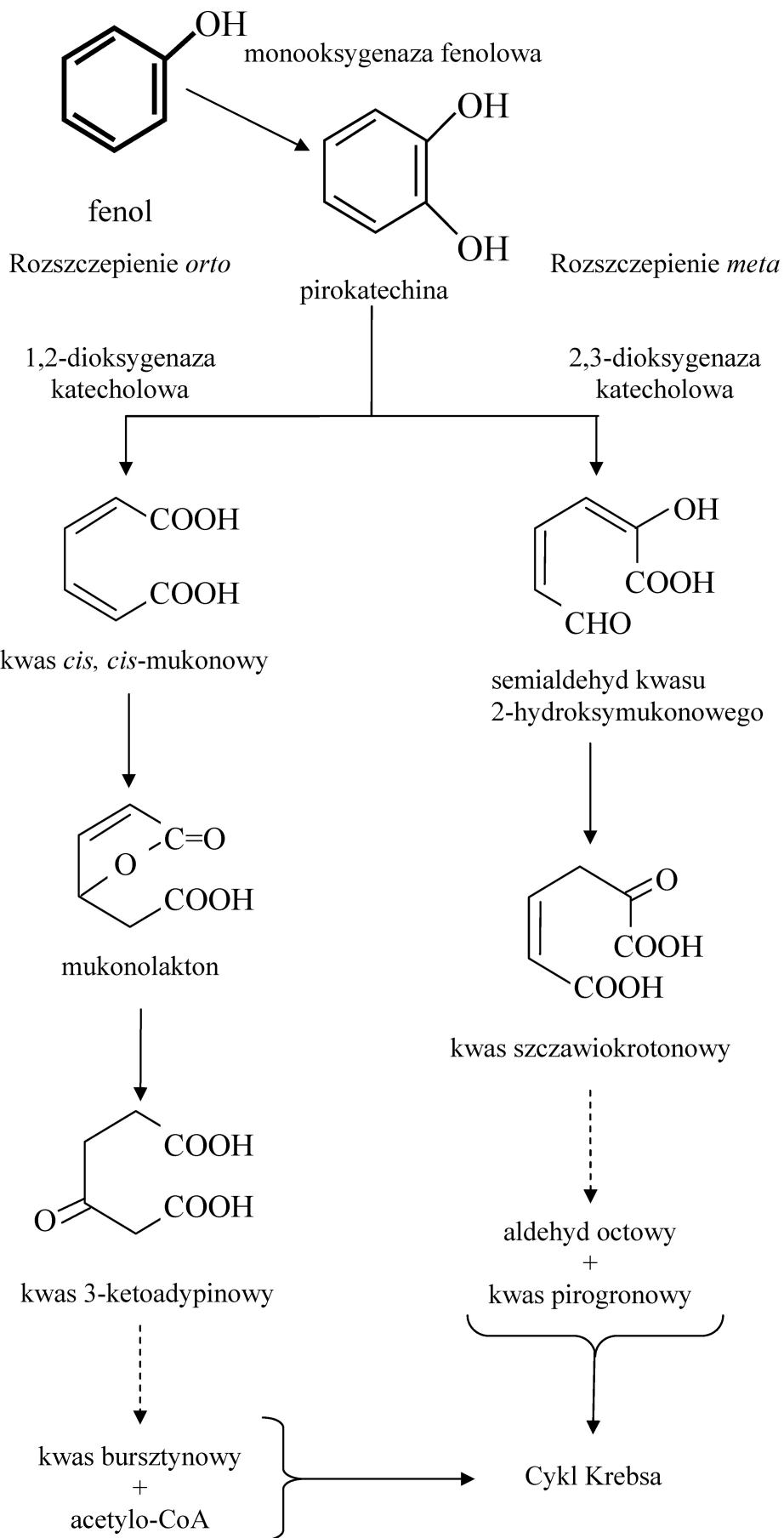
Tabela 2

Hydrofobowość i toksyczność wybranych grup związków organicznych (HEIPIEPER i in., 1994)

| Grupa związków              | Przykład związku     | logP  | LD <sub>50</sub> (mM)* |
|-----------------------------|----------------------|-------|------------------------|
| Alkohole krótkołańcuchowe   | metanol              | -0,76 | 501,1                  |
|                             | etanol               | -0,28 | 223,9                  |
| Słabe kwasy                 | kwas octowy          | -0,23 | 60,0                   |
|                             | kwas masłowy         | 0,81  | —                      |
| Alkohole aromatyczne        | fenol                | 1,45  | 7,94                   |
|                             | 4-chlorofenol        | 2,40  | 1,29                   |
|                             | 2,4-dichlorofenol    | 3,21  | 0,144                  |
|                             | 2,4,5-trichlorofenol | 4,10  | 0,016                  |
|                             | pentachlorofenol     | 5,04  | 0,0067                 |
| Rozpuszczalniki aromatyczne | benzen               | 2,13  | 17,38                  |
|                             | toluen               | 2,48  | 3,58                   |
|                             | styren               | 3,00  | 3,15                   |
|                             | tetralina            | 3,86  | 0,75                   |
| Alkany                      | heksadekan           | 8,80  | > 1 100                |

\* Wartość LD<sub>50</sub> ustalona dla bakterii *Pseudomonas putida*.





**Rys. 1.** Szlaki *orto* i *meta* degradacji struktury aromatycznej fenolu przez bakterie (DAGLEY, 1971; HAIGLER i in., 1992; SMITH, 1994)

SPC2, *Pseudomonas* sp. JS150, *Comamonas testosteroni* P15, *Ralstonia taiwanensis* TJ86, *Rhodococcus* sp. DK17, *Rhodococcus erythropolis* M1, *Ewingella americana*, *Serratia plymuthica* GC i *Rhizobium* sp. CCNWTB 701 (HAIGLER i in., 1992; POWLOWSKI, SHINGLER, 1994; AHAMAD, KUNHI, 1996; YAP i in., 1999; KIM i in., 2002; CHEN i in., 2004; GOSWAMI i in., 2005; KHLEIFAT, 2006; PRADHAN, INGLE, 2007; WEI i in., 2008). Rozkład fenolu przez bakterie w warunkach tlenowych obejmuje dwa kluczowe etapy. W pierwszym następuje wbudowanie grupy hydroksylowej do pierścienia aromatycznego przez hydroksylazę fenolową, enzym należący do monooksygenaz z grupy hydroksylaz. Wbudowuje ona jeden z atomów tlenu cząsteczkowego do pierścienia, a drugi ulega redukcji do wody. W wyniku tej reakcji fenol przekształca się w pirokatechinę. W drugim etapie pierścień aromatyczny pirokatechiny zostaje rozszczepiony między dwoma grupami hydroksylowymi (rozszczerzenie *orto* lub intradiolowe) lub między hydroksylovanym a sąsiadującym z nim niehydroksylovanym atomem węgla (rozszczerzenie *meta* lub ekstradiolowe). Rozszczepienie *orto* katalizuje 1,2-dioxygenaza katecholowa (EC 1.13.11.1). Prowadzi ono do utworzenia kwasu *cis*, *cis*-mukonowego, przekształcanego przez metabolity pośrednie do acetylo-CoA i kwasu bursztynowego, włączanych do cyklu Krebsa. Rozszczepienie *meta* zachodzi pod wpływem 2,3-dioxygenazy katecholowej (EC 1.13.11.2) i prowadzi do utworzenia semialdehydu 2-hydroksymukonowego. Jest on dalej przekształcany do aldehydu octowego i kwasu pirogronowego, również włączanych do cyklu Krebsa (DAGLEY, 1971; HAIGLER i in., 1992; POWLOWSKI, SHINGLER, 1994; SMITH, 1994; WATANABE, 2002). Szlak *orto* i *meta* rozkładu fenolu przez bakterie ilustruje rys. 1.

Informacja genetyczna o syntezie enzymów katalizujących rozkład pierścienia aromatycznego może być zawarta w chromosomie bakteryjnym lub w plazmidach degradacyjnych. Powszechnie uważa się, że szlak *orto* kodowany jest chromosomalnie, a szlak *meta* — plazmidowo (VAN DER MEER i in., 1992). Chromosomalnie kodowaną drogę *orto* rozkładu fenolu stwierdzono na przykład u szczepów *Pseudomonas stutzeri* SPC2 i *Serratia plymuthica* GC (AHAMAD, KUNHI, 1996; PRADHAN, INGLE, 2007), plazmidowo zależną *meta* — u szczepu *Ewingella americana* i *Pseudomonas* sp. CF600 (POWLOWSKI, SHINGLER, 1994; KHLEIFAT, 2006), równoczesną indukcję enzymów obu tych szlaków u *Pseudomonas* sp. JS150 (HAIGLER i in., 1992), a chromosomalnie kodowaną drogę *meta* — u *Pseudomonas putida* BH i *Pseudomonas picketti* PKO1 (KUKOR, OLSEN, 1991; NISHIHARA i in., 1994).

## 1.4. Bakteryjne kwasy tłuszczowe

Głównym miejscem oddziaływania fenolu i innych związków aromatycznych na komórki bakterii jest błona cytoplazmatyczna. W wyniku kontaktu tych związków z błoną zmienia się jej struktura, głównie skład fosfolipidowych kwasów tłuszczowych (PLFAs), oraz jej właściwości (KEWELOH i in., 1991).

Kwasy tłuszczowe (FAs, ang. *fatty acids*) u bakterii występują głównie w błonach komórkowych jako składniki acylowe fosfolipidów, glikolipidów i glikofosfolipidów. Rzadko są spotykane w komórce w postaci wolnej. Jedynie 5—10% kwasów tłuszczowych jest niezwiązanych z błonami i w postaci lipidów obojętnych (hopanoidów i karotenoidów) pełnią w cytozolu funkcję zapasową (MORDARSKA, 1984; HUIJBREGTS i in., 2000).

Skład kwasów tłuszczowych u bakterii jest bardziej zróżnicowany niż u roślin i zwierząt. Za najbardziej charakterystyczne uważa się nasycone, prostolaniczne kwasy tłuszczowe (STRAFAs, ang. *straight chain fatty acids*) o długości łańcucha acylowego 14—20 atomów węgla. Najpowszechniej występują wśród nich *n*-heksadekanian (kwas palmitynowy) i *n*-oktadekanian (kwas stearynowy) (FINEAN, MITCHELL, 1981; RUSSELL, FUKUNAGA, 1990; RUSSELL, 1995). U niektórych bakterii z rodzaju *Rhizobium* i *Mesorhizobium* spotyka się również nietypowe kwasy o dłuższych łańcuchach acylowych, głównie w lipidzie A lipopolisacharydu (LPS), zawierające 27—28 atomów węgla (CHOMA, 1999; GRONOW, BRADE, 2001; KOMANIECKA, CHOMA, 2001).

Oprócz kwasów nasyconych bakterie syntetyzują kwasy jednonienasycone (MUFAs, ang. *monounsaturated fatty acids*) z wiązaniem podwójnym, najczęściej między C9 i C10, oraz wielonienasycone (PUFAs, ang. *polyunsaturated fatty acids*). Nienasycone kwasy tłuszczowe mogą zawierać maksymalnie do 6 wiązań podwójnych, jednak takie wielonienasycone kwasy występują u bakterii rzadko i spotyka się je jedynie u morskich psychrofilii i cyjanobakterii (FINEAN, MITCHELL, 1981; RUSSELL, FUKUNAGA, 1990; NICHOLS i in., 1993; HAMAMOTO i in., 1994). Wiązania podwójne w kwasach nienasyconych nie mają charakteru wiązań sprzężonych, oddzielone są od siebie grupą metylenową  $-CH_2-$ . W odróżnieniu od pojedynczych są sztywne, co uniemożliwia rotację wokół ich osi. Najczęściej występują w konfiguracji *cis*, powodującej wygięcie łańcucha acylowego o kąt  $30^\circ$ . Kwasy nienasycone w konfiguracji *trans* mają natomiast bardziej rozciągniętą strukturę, co czyni je przestrzennie podobnymi do kwasów nasyconych. W związku z tym

konfiguracja *trans*, w odróżnieniu od *cis*, zapewnia bardziej uporządkowany układ fosfolipidów w błonie (DIEFENBACH i in., 1992; HEIPIEPER i in., 1994). Reakcję izomeryzacji *cis*-nienasyconych kwasów tłuszczowych do postaci *trans* katalizuje monomeryczny, perioplazmatyczny enzym *cis-trans* izomeraza (Cti) o masie molekularnej 70–80 kDa, z kowalencyjnie związanym hemem (HOLTWICK i in., 1999; PEDROTTA, WITHOLT, 1999; BERNAL i in., 2007). Porównanie sekwencji aminokwasowych izomeraż izolowanych z *Pseudomonas putida* P8, *Pseudomonas putida* KT 2440, *Pseudomonas putida* DOT-T1E i *Pseudomonas oleovorans* wykazało wysoką ich homologię, wynoszącą 95% (RAMOS i in., 2002). Z badań HEIPIEPERA i in. (1992) wynika, że reakcja izomeryzacji *cis/trans* zachodzi wyłącznie wtedy, gdy zahamowaniu w komórce ulega biosynteza kwasów tłuszczowych. Ilość *trans*-nienasyconych kwasów tłuszczowych u bakterii zależy przede wszystkim od fazy wzrostu, składu podłoża oraz czynników środowiskowych (KEWELOH, HEIPIEPER, 1996). Liczne pomiary temperatury przejścia ( $T_m$ ) z fazy żelowej błony do ciekłokrystalicznej wykazały, że zastąpienie konfiguracji *cis* konfiguracją *trans* w fosfatydyloetanolinie powoduje jej wzrost o 18–31°C, w zależności od struktury łańcucha acylowego w cząsteczce lipidu. Skutkiem tego jest znaczące zmniejszenie płynności błony (CRONAN, GELMANN, 1975).

Kolejną ważną grupą u bakterii są kwasy rozgałęzione (BRANCFAs, ang. *branched fatty acids*), które mogą mieć postać *iso* lub *anteiso*. W izomerach *iso* grupa metylowa –CH<sub>3</sub> podstawiona jest przy węglu C2 od końca metylowego ( $\omega$ ) łańcucha acylowego, a w postaci *anteiso* — przy węglu C3. Niektóre bakterie, na przykład *Rhodococcus opacus* i *Streptomyces* sp., zawierają kwasy tłuszczowe, w których grupa –CH<sub>3</sub> podstawiona jest przy C10, a u wielu gatunków z rodzaju *Bacillus* spotyka się także kwasy dimetylowane z grupą –CH<sub>3</sub> przy C2 i C4 od końca karboksylowego kwasu (MORGAN, WINSTANLEY, 1997; TSITKO i in., 1999, CARBALLEIRA i in., 2001). Kwasy rozgałęzione występują w znacznych ilościach u bakterii Gram-dodatnich. U przedstawicieli rodzajów *Bacillus*, *Micrococcus* i *Staphylococcus*, wspólnie z prostołańcuchowymi (do 10%), mogą stanowić nawet 50–60% ogólnej zawartości kwasów. Z kolei u bakterii Gram-ujemnych kwasy rozgałęzione nie występują lub jest ich znacznie mniej, natomiast zawierają większe ilości kwasów nasyconych, jednonienasyconych i cyklopropanowych (DENICH i in., 2003). Substratami do syntezy kwasów rozgałęzionych mogą być  $\alpha$ -keto-kwasy (pochodne waliny, leucyny i izoleucyny) lub egzogenne, krótkołańcuchowe kwasy karboksylowe

(izomasłowy, izowalerianowy i 2-metylomasłowy). Zarówno kwasy o izomerii *iso*, jak i kwasy o izomerii *anteiso* powstają *de novo* i pozycja rozgałęzienia nie może być modyfikowana postsyntezytycznie (KANEDA, 1991). Ich obecność zwiększa płynność błony i sprawia, że nie przyjmuje ona struktury krystalicznej (RUSSELL, FUKUNAGA, 1990).

Spośród bakteryjnych kwasów tłuszczowych najbardziej złożoną budową odznaczają się kwasy cyklopropanowe (CFAs, ang. *cyclopropyl fatty acids*). Pierwszym odkrytym kwasem o budowie cyklicznej był *cis*-11,12-metylene-oktadekenian, 19-węglowy analog kwasu *cis*-wakcenowego, będącego głównym fosfolipidowym kwasem nienasyconym u *Lactobacillus arabinosus* (HOFMANN, LUCAS, 1950). Zdolność do syntezy kwasów cyklopropanowych mają zarówno bakterie Gram-ujemne (*Alcaligenes*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas* i *Serratia*), jak i Gram-dodatnie (*Arthrobacter*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus* i *Streptococcus*). Nie stwierdzono natomiast ich obecności w błonach bakterii z rodzajów: *Corynebacterium*, *Streptomyces*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Rhodobacter* i *Leptospira* (GROGAN, CRONAN, 1997). Kwasy z pierścieniem cyklopropanowym powstają w błonie cytoplazmatycznej na skutek modyfikacji jednonienasyconych łańcuchów acylowych fosfolipidów. Reakcję tę przeprowadza syntaza cyklopropanowa, która włącza do podwójnego wiązania w konfiguracji *cis* grupę –CH<sub>2</sub>, pochodzącą z *S*-adenozynometioniny. Enzym wiąże się odwracalnie z dwuwarstwą lipidową i odnajduje łańcuchy acylowe o właściwej geometrii, będące substratem reakcji. Kwasy o budowie cyklicznej powstają najczęściej w późnej fazie logarytmicznego wzrostu lub w fazie stacjonarnej (WANG, CRONAN, 1994). Ich biologiczna rola nie jest wyjaśniona. Uważa się, że pierścień cyklopropanowy zabezpiecza wiązanie podwójne przed utlenieniem, dzięki czemu stabilizuje lipidy. Tworzenie CFAs zapewnia także większą oporność patogennych szczepów *E. coli* na zmiany pH, a w strukturze kwasów mykoloowych prawdopodobnie odpowiada za patogenność wielu szczepów *Mycobacterium* (GROGAN, CRONAN, 1997; CHANG, CRONAN, 1999; CRONAN, 2002).

Inną grupę kwasów tłuszczowych u bakterii stanowią hydroksykwasy (HYFAs, ang. *hydroxy fatty acids*), szeroko rozpowszechnione u pałeczek Gram-ujemnych i promieniowców. U bakterii Gram-ujemnych występują w lipidzie A lipolisacharydów, w tłuszczach związanych z ornityną oraz w postaci polimeru kwasu polihydroksymasłowego (PHB) (MORDARSKA, 1984; DAS i in., 1994; DARVEAU, 1998). Kwasy hydroksylowe mogą przyjmować postać  $\alpha$  lub  $\beta$ . W postaci  $\alpha$  grupa –OH jest podstawiona przy węglu pierwszym od karboksylo-

wego końca kwasu, a w postaci  $\beta$  — przy węglu drugim. U bakterii  $\alpha$ -hydroksykwasu pojawiają się rzadko i ich występowanie ogranicza się do kilku ich rodzajów, z kolei  $\beta$ -hydroksykwasu są powszechne zarówno u bakterii Gram-ujemnych, jak i Gram-dodatnich. Dodatkowe grupy hydroksylowe w łańcuchu węglowodorowym nadają kwasom tłuszczowym specyficzne właściwości, przede wszystkim wyższą lepkość i reaktywność w porównaniu z kwasami nierozgałęzionymi. Zdolność do syntezy mono-, di- i trihydroksykwasów z prekursorów w postaci nienasyconych kwasów tłuszczowych z wiązaniem podwójnym przy węglu C9 w konfiguracji *cis* ma na przykład nowo opisany szczep *Pseudomonas aeruginosa* PR3 (BAE i in., 2007).

Kwasy tłuszczowe wbudowane w fosfolipidy mają istotne znaczenie dla struktury i funkcji błony. Utrzymują jej integralną strukturę, wpływają na przepuszczalność, a także zwiększają wydajność sekrecji niektórych białek enzymatycznych, na przykład pullanazy (CRONAN, GELMANN, 1975; DE KRUIJFF, 1997; DENICH i in., 2003). Właściwości błony zależą od stosunku kwasów prostotańcuchowych do rozgałęzionych oraz nienasyconych do cyklopropanowych. Wzrost zawartości kwasów nienasyconych zwiększa płynność błony i nasila procesy dyfuzyjne, z kolei wzrost udziału kwasów rozgałęzionych i cyklopropanowych usztywnia strukturę błony i obniża jej przepuszczalność.

Kwasy tłuszczowe należą do jednych z najbardziej dynamicznych składników komórek bakteryjnych. Często podlegają wymianie i modyfikacjom w lipidach pod wpływem wielu czynników, w tym toksycznych związków aromatycznych. Dzięki tej zdolności bakterie mogą się łatwo przystosowywać do kolejnych faz wzrostu i adaptować do zmieniających warunków środowiskowych (ŠAJBIDOR, 1997).

## 1.5. Kwasy tłuszczowe jako biomarkery

Wiele gatunków bakterii lub fizjologicznie zbliżonych grup mikroorganizmów może być wykrywanych w środowisku na podstawie charakterystycznych wyłącznie dla nich fosfolipidowych kwasów tłuszczowych. Ich ilościowa i jakościowa charakterystyka pozwala także ocenić żywą biomasę mikroorganizmów oraz stan fizjologiczny komórek (WHITE, RINGELBERG, 1997; KOZDRÓJ, VAN ELSAS, 2001).

Na podstawie analizy kwasów tłuszczowych ekstrahowanych z osadów dennych wyróżniono następujące grupy mikroorganizmów: mikroeuکاریota (wielonienasycone kwasy tłuszczowe), tlenowe pro-

kariota (jednonienasycone kwasy tłuszczowe), bakterie Gram-dodatnie i niektóre beztlenowe (nasycone i rozgałęzione kwasy tłuszczowe o długości łańcucha acylowego od C14 do C16), bakterie redukujące siarczany i pozostałe beztlenowe (nasycone i rozgałęzione kwasy tłuszczowe o długości łańcucha acylowego od C16 do C19) (MORGAN, WINSTANLEY, 1997). Rozgałęzione kwasy tłuszczowe wskazują na obecność bakterii beztlenowych i redukujących siarczany z rodzaju *Desulfovibrio*. Kwas 16:0 10Me uważany jest za markerowy dla rodzaju *Desulfobacter*, ponieważ nie występuje u innych bakterii redukujących siarczany. Rozgałęzione kwasy o izomerii *iso* i *anteiso* są charakterystyczne dla bakterii Gram-dodatnich i dla rodzajów *Cytophaga* oraz *Flavobacterium*, a kwasy cyklopropanowe — dla bakterii Gram-ujemnych i wielu anaerobowych Gram-dodatnich (HAACK i in., 1994). Gram-ujemne bakterie mają też unikatowe kwasy hydroksylowe w lipidowej części LPS, w błonie zewnętrznej. Jednonienasycone kwasy tłuszczowe są powszechne, lecz niespecyficzne dla beztlenowych bakterii Gram-ujemnych. Kwasy wielonienasycone występują głównie u cyjanobakterii. Dla promieniowców charakterystyczne są kwasy z grupą  $-\text{CH}_3$  przy C10 (ZELLES, 1999 a). Wysoka zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych w porównaniu z wielonienasyconymi wskazuje na dominację bakterii w środowisku. Z kolei różnice w udziale kwasów rozgałęzionych do jednonienasyconych mogą być wykorzystane do określenia proporcji bakterii Gram-dodatnich do Gram-ujemnych w wodach morskich (MORGAN, WINSTANLEY, 1997). Wyróżniono także kilka kwasów wskazujących na obecność w glebie grzybów. Należą do nich długołańcuchowe kwasy nasycone (24:0—26:0), nienasycony kwas 18:2  $\omega$ 6,9 (stosowany do obliczania biomasy grzybów) oraz 16:1  $\omega$ 5 (typowy dla grzybów mikoryzowych) (WELLS i in., 1996; FROSTEGÅRD, BÅÅTH, 1996; KELLY i in., 1999 b). Markerowe kwasy tłuszczowe wybranych gatunków, rodzajów i grup mikrobiologicznych ilustruje tabela 3.

Analiza ogólnej zawartości PLFAs może służyć także do oznaczenia biomasy drobnoustrojów w próbach środowiskowych (FROSTEGÅRD, BÅÅTH, 1996). Fosfolipidy występują jedynie w nienaruszonych błonach, a więc w żywych komórkach. W krótkim czasie po śmierci komórki endogenne fosfolipazy hydrolizują fosfolipidy, uwalniając polarną grupę fosforanową. Powstające diglicerydy mają identyczny skład kwasów tłuszczowych z oryginalnymi fosfolipidami. Dzięki temu fosfolipidowe kwasy tłuszczowe mogą być użyte do oznaczenia ogólnej żywej biomasy (WHITE, RINGELBERG, 1997). WILKE i in. (2004) wykorzystali PLFAs do oceny

Markerowe kwasy tłuszczowe wybranych gatunków, rodzajów i grup mikrobiologicznych

| Gatunek, rodzaj, grupa mikrobiologiczna | Markerowe kwasy tłuszczowe   | Literatura   |
|---|--|--|
| <i>Desulfovibrio</i>                    | 15:1 $\omega 7c$ iso, 17:1 $\omega 7c$ iso, 19:1 $\omega 7c$ iso   | EDLUND i in. (1985)  |
| <i>Desulfobacter</i>                    | 16:0 10Me, 18:0 cy ( $\omega 7,8$ )  | DOWLING i in. (1986)   |
| <i>Arthrobacter</i>                     | 15:0 anteiso, 17:0 (wysoka zawartość)  | HAACK i in. (1994)   |
| <i>Pseudomonas</i>                      | 16:0 i 16:1 $\omega 7c$ (równoważna zawartość)<br>18:1 $\omega 7c/\omega 9t/\omega 12t$  | HAACK i in. (1994)   |
| <i>Bacteroides</i>                      | kwasy tłuszczowe z parzystą liczbą C   | OLSSON, PERSSON (1999)   |
| <i>Thiobacillus</i>                     | 17:1 $\omega 5$ iso, 18:1 $\omega 6$ 10Me, 18:1 $\omega 6$ 11Me  | KERGER i in. (1986)  |
| <i>Vibrio cholerae</i>                  | 19:1 11Me, 18: 2 $\omega 6,9$  | GUCKERT i in. (1986)   |
| Metanotrofy                             | 16:1 $\omega 8c$ , 16:1 $\omega 5c$  | NICHOLS i in. (1987)   |
| Bakterie Gram-ujemne                    | hydroksykwasy (np. 16:1 3OH, 18:1 3OH), kwasy nienasycone (np. 16:1 $\omega 5c$ , 16:1 $\omega 7c$ , 18:1 $\omega 7c$ ), kwasy cyklopropanowe (17:0 cy, 19:0 cy) | CAVIGELLI i in. (1995), ZELLES (1999a)   |
| Bakterie Gram-dodatnie                  | kwasy tłuszczowe iso i anteiso (np. 15:0 iso, 15:0 anteiso, 16:0 iso, 17:0 iso, 17:0 anteiso)  | PENNANEN i in. (1998) ZELLES (1999 a, b)   |
| <i>Cytophaga-Flavobacterium</i>         | 16:1 $\omega 5c$   | FROSTEGÅRD i in. (1993 a), KELLY i in. (1999 a)                                      |
| <i>Actinomycetales</i>                  | kwasy tłuszczowe z grupą 10Me (np. 16:0 10Me, 17:0 10Me, 18:0 10Me)  | FROSTEGÅRD i in. (1993 a), KELLY i in. (1999 a)                                      |
| Grzyby                                  | 16:1 $\omega 5c$ , 18:1 $\omega 9c$ , 18:2 $\omega 6,9c$ , 18:3 $\omega 6$ , 20:4, 21:0, 23:0, 25:0  | OLSSON (1997), FROSTEGÅRD i in. (1993 b, 1996), LINDAHL i in. (1997) ZELLES (1999 b) |

biomasy mikroorganizmów w glebie pochodzącej z terenów leżących w pobliżu zakładu produkującego materiały wybuchowe i skażonej 2,4,6-trinitrotoluenem (TNT). W glebie zanieczyszczonej tym związkami stężenie PLFAs wynosiło 46,6 nmoli g<sup>-1</sup> gleby, natomiast w glebie nieskażonej było dwukrotnie wyższe (111,5 nmoli g<sup>-1</sup> gleby), co świadczyło o toksycznym działaniu TNT na komórki bakterii.

Profil PLFAs może służyć także do oceny stanu fizjologicznego komórek, zmieniającego się pod wpływem różnych czynników, takich jak: temperatura, ciśnienie, pH, dostępność tlenu, wody i składników odżywczych oraz obecność związków toksycznych. Zależy on także od wieku kultury i aktywności enzymatycznej mikroorganizmów (ŠAJBIDOR, 1997; WHITE, RINGELBERG, 1997; RAMOS i in., 2001). W warunkach ograniczonego dostępu substancji pokarmowych bakterie syntetyzują kwasy poli- $\beta$ -hydroksyalkanowe (PHA), nie rosną i nie rozmnażają się. Dostarczenie niezbędnych do wzrostu składników powoduje rozkład PHA i tworzenie PLFAs. Głodzenie, susza i długotrwała ekspozycja na czynniki indukujące przejście bakterii do stacjonarnej fazy wzrostu prowadzi do przekształcenia nienasyconych kwasów tłuszczowych 16:1  $\omega 7c$  i 18:1  $\omega 7c$  w odpowiadające im kwasy cyklopropanowe 17:0 cy i 19:0 cy (GUCKERT i in., 1986; KIEFT i in., 1994). Stosunek kwasów nienasyconych

do cyklopropanowych zależy od mikroorganizmu i środowiska, które ten zasiedla, ale zwykle przyjmuje on wartość 0,05 w fazie logarytmicznego wzrostu i 2,5 lub wyższą w fazie stacjonarnej. LOFFAGEN i in. (2007) wykazali, że brak składników odżywczych prowadził w komórkach szczepu *Pseudomonas putida* P8 do wzrostu wartości stosunku kwasów cyklopropanowych do *cis*-nienasyconych (*cyklo/cis*) z 0,1 do 1,55. Z kolei w środowiskach zanieczyszczonych związkami organicznymi (alkoholami, fenolami i krótkołańcuchowymi kwasami karboksylowymi) u bakterii dochodzi do wzrostu zawartości *trans*-nienasyconych kwasów tłuszczowych w porównaniu z postacią *cis* (HEIPIEPER i in., 1995). Wzrost wartości stosunku kwasów tłuszczowych o konfiguracji *trans/cis* powyżej 0,1 świadczy również o starzeniu się komórek bakteryjnych. Natomiast jego wartość 0,05 lub niższa wskazuje na ich dobrą kondycję i brak wpływu stresowych czynników środowiskowych.

## 1.6. Wpływ związków aromatycznych na błony bakteryjne

Związki o strukturze aromatycznej wykazują duże powinowactwo do błony komórkowej bakterii,

wnikają do jej lipofilowego obszaru i ograniczają oddziaływanie między łańcuchami acylowymi fosfolipidowych kwasów tłuszczowych. Rezultatem tego jest zaburzenie jej integralnej struktury, wzrost przepuszczalności i płynności. Powoduje to zmianę potencjału błonowego, usuwanie lipidów i białek z błony oraz wypływ jonów i substancji drobnocząsteczkowych z komórki. Prowadzi to do zahamowania oddychania i wzrostu bakterii, a nawet do lizy komórek (HEIPIEPER i in., 1994; SIKKEMA i in., 1994, 1995; ČERTIK i in., 2003; DERCOVÁ i in., 2004).

Toksyczność poszczególnych związków aromatycznych zależy od ich chemicznej struktury, stopnia hydrofobowości, aktualnego stężenia w błonie, lokalizacji w dwuwarstwie lipidowej i oddziaływań ze składnikami błony (SIKKEMA i in., 1994). Związki amfipatyczne wnikają i rozpuszczają się w błonie dość łatwo, ze względu na duże podobieństwo do fosfolipidów błonowych. Związki aromatyczne z podstawnikami hydrofilowymi, szczególnie fenole, łatwo rozpuszczają się w warstwie lipidowej błony i wskutek tego są bardziej toksyczne w porównaniu z innymi związkami organicznymi. W zależności od miejsca lokalizacji związków aromatycznych zmieniają się właściwości błony. Związki lipofilowe wchodzi w interakcje z hydrofobowymi łańcuchami acylowymi, co wyraźnie zmienia powierzchnię błony (CORNELL, SEPAROVIC, 1983). Wykazano, że zjawisko to wywołują przede wszystkim związki, których logP wynosi 2–5 (benzen, toluen, *o*-ksylen, naftalen i bifenylo). Z badań prowadzonych z użyciem liposomów znakowanych fluorescencyjnie  $\beta$ -chlorkiem rodaminy oktadekanylu wynika, że zwiększenie powierzchni błony jest spowodowane oddziaływaniem tych związków wyłącznie z łańcuchami acylowymi lipidów zewnętrznej strony dwuwarstwy lipidowej w taki sposób, że jedna cząsteczka związku przypada na dwie cząsteczki fosfolipidów (HEIPIEPER i in., 1994). Związki hydrofilowe powodują z kolei hydratację grup polarnych (ROTTENBERG, 1992). Takie związki, jak: tetralina, bifenylo i antracen, wnikają pomiędzy łańcuchy acylowe fosfolipidów, powodując „pęcznienie błony” i wzrost jej płynności (SIKKEMA i in., 1994). Dla porównania, alkanany hydrofobowe (np. heksadekan, logP = 8,8) nie uszkadzają błony, ponieważ oddziałują z łańcuchami kwasów tłuszczowych zarówno wewnętrznej, jak i zewnętrznej dwuwarstwy lipidowej. Rezultatem takiego oddziaływania jest większe uporządkowanie lipidów, mniejsza przepuszczalność i płynność, ale zwiększenie się grubości błony (MCINTOSH i in., 1980).

## 1.7. Mechanizmy regulacji płynności błony bakterii w obecności związków aromatycznych

Bakterie w środowisku są narażone na działanie różnorodnych czynników, takich jak zmiany temperatury, dostępność składników odżywczych i wody oraz na obecność związków aromatycznych. W odpowiedzi na fizykochemiczny stres uruchamiają one kompleksowe mechanizmy regulacyjne, dzięki którym łatwo przystosowują się do zmieniających się warunków środowiskowych (SIKKEMA i in., 1994, 1995; WEBER, DE BONT, 1996; IVANOVA i in., 1999; BENEY, GERVAIS, 2001; RAMOS i in., 1997, 2001; SAKAMOTO, MURATA, 2002; CHICHIB i in., 2005; UNELL i in., 2007).

Jednym z podstawowych mechanizmów adaptacji bakterii do obecności związków o strukturze aromatycznej są zmiany składu fosfolipidowych kwasów tłuszczowych dotyczące stopnia ich nasycenia, długości łańcuchów acylowych, postsyntezytycznych ich modyfikacji oraz stosunku ilości lipidów do białek błonowych. Wzrost stopnia nasycenia lipidów błonowych w wyniku syntezy *de novo* kwasów tłuszczowych (16:0 i 18:0) u szczepu *E. coli* K-12 w obecności subletalnych stężeń fenolu, 4-chlorofenolu i *p*-krezolu wykazali HEIPIEPER i in. (1991). DIEFENBACH i in. (1992) u szczepu *Pseudomonas putida* P8 obserwowali korelację pomiędzy wzrostem stopnia nasycenia lipidów błony a tolerancją komórek na wysokie stężenie 4-chlorofenolu (250 mg l<sup>-1</sup>), a KIM i in. (2001) u *Ralstonia eutropha* H850, hodowanego z dodatkiem bifenylo w dawce 0,1%. Wyniki te wskazują, że synteza *de novo* kwasów tłuszczowych jest odpowiedzią komórek bakterii na błonowo-aktywne związki aromatyczne. Zachodzi ona jednak wyłącznie w komórkach rosnących, natomiast stężenia letalne hamują jej przebieg. Uważa się, że większość nowo zsyntetyzowanych kwasów służy do naprawy uszkodzonej przez te związki błony (LOFFHAGEN i in., 1995; HÄRTIG i in., 2005).

Innym mechanizmem regulacji płynności błony jest reakcja izomeryzacji *cis*-nienasyconych kwasów tłuszczowych do postaci *trans*. Zachodzi ona wtedy, gdy ustaje biosynteza kwasów tłuszczowych, a więc w komórkach nierosnących. Reakcję taką przeprowadzały na przykład bakterie *Pseudomonas putida* P8 w obecności fenolu, *Pseudomonas putida* NCTC 10936 w obecności 4-chlorofenolu i *Pseudomonas putida* S12 w obecności fenolu, *p*-krezolu i toluenu (DIEFENBACH i in., 1992; DIEFENBACH, KEWELOH, 1994; HEIPIEPER, DE BONT, 1994; HEIPIEPER i in., 1995; LOFFHAGEN i in., 2001). Nie jest to jednak reakcja zachodząca u wszystkich bakterii. Nie obserwowano jej w obecności związków o strukturze aro-

matycznej u szczepów *Rhodococcus* sp. 33 i *Shewanella putrefaciens* ACAM 342 (NICHOLS i in., 1994; GUTIÉRREZ i in., 1999).

Ekspozycja bakterii na działanie toksycznych związków aromatycznych prowadzi też do syntezy rozgałęzionych, nasyconych kwasów tłuszczowych o izomerii *iso* i *anteiso*. TSITKO i in. (1999) stwierdzili 5—10-krotny wzrost udziału tych kwasów u szczepu *Rhodococcus opacus*, hodowanego z dodatkiem benzenu, fenolu, 4-chlorofenolu, chlorobenzenu i toluenu. Podobnie wysoką zawartością procentową kwasów o izomerii *iso* i *anteiso* charakteryzowały się szczepy *Pseudomonas stutzeri* i *Pseudomonas putida* w czasie degradacji naftalenu oraz *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 w temperaturze 5°C w obecności fenolu, 4-nitrofenolu i 4-chlorofenolu (MROZIK i in., 2005; UNELL i in., 2007).

Kolejnym, znanym mechanizmem postsyntetycznych modyfikacji lipidów błonowych jest tworzenie kwasów z pierścieniem cyklopropanowym. Obserwowany w profilu kwasów tłuszczowych znaczny wzrost udziału tych kwasów, izolowanych z komórek *Ralstonia eutropha*, hodowanych w podłożu z dodatkiem bifenyłu oraz z *Pseudomonas stutzeri* i *Pseudomonas vesicularis*, rozkładających pirokatechinę i fenol, może świadczyć o istotnej roli wymienionych kwasów w regulacji płynności błony komórkowej tych bakterii (KIM i in., 2001; MROZIK i in., 2004).

Na fizykochemiczne właściwości błony ma także wpływ skład hydrofilowych „głów” fosfolipidów. WEBER i in. (1994) wykazali, że u *Pseudomonas putida* S12 w obecności toluenu dochodziło do zmniejszenia udziału fosfatydyloetanolaminy (PE) w błonie. PE jest fosfolipidem o stosunkowo małej powierzchni „głowy” w porównaniu z fosfatydyloglicerolem (PG) i difosfatydyloglicerolem (DPG). Spadek udziału PE, a wzrost PG i DPG powodowały zwiększenie średniej fosfolipidowej powierzchni „głowy”, prawdopodobnie w celu wyrównania większej objętości łańcuchów acylowych, wywołanej akumulacją toluenu w błonie. Wbudowanie PG i DPG do błony prowadzi do jej usztywnienia i zmniejszenia stopnia nieuporządkowania lipidów, wywołanego obecnością cząsteczek toluenu między łańcuchami acylowymi w sąsiedztwie występujących grup polarnych. Zmiany składu „głów” polarnych fosfolipidów są mniej powszechnymi modyfikacjami błony niż zmiany w składzie kwasów tłuszczowych, ale z powodu innej lokalizacji ładunków w obszarach polarnych mogą istotnie wpływać na interakcje lipidy—białka błonowe (ROSAS, 1980; SUWALSKY i in., 1990).

Akumulacja związków aromatycznych w dwuwarstwie lipidowej może indukować syntezę do-

datkowych białek błonowych. Zjawisko to obserwowali KEWELOH i in. (1990) u szczepu *E. coli* K-12 hodowanego na podłożu z dodatkiem fenolu w stężeniu 0,5 g l<sup>-1</sup>. W wyniku rozdziału elektroforetycznego zidentyfikowali pojedyncze białko błonowe o masie molekularnej 45 kDa, którego ilość była znacznie wyższa w porównaniu z komórkami hodowanymi bez dodatku tego związku. Można sądzić, że wzrost zawartości specyficznego białka lub kilku białek zwiększa upakowanie łańcuchów acylowych w fosfolipidach. Stanowi to ochronę komórki przed utratą jonów i ważnych metabolitów.

## 1.8. Rozkład związków aromatycznych w glebie

Rosnące zapotrzebowanie na produkty przemysłu petrochemicznego oraz wynikająca z tego konieczność ich magazynowania i dystrybucji stwarzają poważne zagrożenie dla środowiska glebowego. Produkty ropopochodne i inne substancje o strukturze aromatycznej rozpraszają się w glebie w postaci substancji pływających na jej powierzchni, rozpuszczonych w wodzie, zanieczyszczeń zaadsorbowanych na cząstkach gleby oraz gazów. Ich obecność w glebie wpływa w istotny sposób na jej fizyczne, chemiczne i biologiczne właściwości. Powodują one przede wszystkim zmiany w ilości i składzie chemicznych substancji organicznych w glebie, obniżenie jej pojemności wodnej i utrudnienie wymiany gazowej, zaburzają stosunek zawartości węgla organicznego do azotu i fosforu oraz wpływają na właściwości koloidów glebowych, w tym wymianę jonową i pH (FINE i in., 1997; INDERJIT, MALLIK, 1997). Toksyczne węglowodory aromatyczne znajduje się we wszystkich warstwach gleby. Ich stężenie w glebach leśnych waha się od 5 µg kg<sup>-1</sup> do 100 µg kg<sup>-1</sup> gleby. Substancje aromatyczne dostają się w głąb gleby wraz z liśćmi oraz igłami, na których są adsorbowane. W glebach rolniczych ich stężenie wynosi od 10 µg kg<sup>-1</sup> do 100 µg kg<sup>-1</sup> gleby. Wysokie stężenie występuje w glebach rejonów przemysłowych, w których może wynosić do 3000 µg kg<sup>-1</sup> gleby (MENZIE i in., 1992). Wartość ta niejednokrotnie jest przekroczona, na przykład na terenach rafinerii, w miejscach niekontrolowanego wycieku substancji ropopochodnych oraz przetadunku paliw.

Rozkład fenolu i innych związków aromatycznych przez wyselekcjonowane szczepy bakterii, przeprowadzany w podłożach płynnych w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych nie w pełni wyjaśnia, jak proces ten zachodzi w warunkach natu-

ralnych w środowisku przyrodniczym. Dlatego też konieczne wydaje się prowadzenie badań nad ich rozkładem, z uwzględnieniem czynników środowiskowych, wpływających na wydajność procesu ich biodegradacji.

Rozkład związków aromatycznych w glebie jest procesem złożonym. Zależy nie tylko od składu zespołów mikroorganizmów glebowych, lecz także od warunków środowiskowych. ROMANTSCHUK i in. (2000) wyróżnili pięć podstawowych czynników decydujących o rozkładzie substancji organicznych w glebie. Należą do nich: temperatura, dostęp tlenu atmosferycznego, stężenie substancji odżywczych i kosubstratów, biodostępność związku i potencjał degradacyjny zasiedlających ją mikroorganizmów. Do czynników wpływających na przemiany tych zanieczyszczeń w glebie należą również: pH, zawartość wody, struktura i typ gleby oraz wcześniejsza ekspozycja mikroorganizmów na ich obecność. Nie bez znaczenia jest także budowa chemiczna i właściwości substancji stanowiącej skażenie (toksyczność, biodegradowalność i stężenie). Z czynników biotycznych niezwykle ważna jest bioróżnorodność mikroorganizmów zaangażowanych w procesy degradacyjne, interakcje między nimi, stabilność i aktywność enzymatyczna mikroorganizmów, ich biomasa i zdolność do chemotaksji (VOGEL, 1996).

Gleba odznacza się heterogenicznością przestrzenną i od stopnia jej agregacji zależy nie tylko aktywność mikroorganizmów, lecz także biodostępność związków aromatycznych. Dzięki tej właściwości w tej samej glebie powstają zróżnicowane siedliska mikroorganizmów o odmiennej zawartości składników odżywczych i wody (RANJARD, RICHAUME, 2001; BRONICK, LAL, 2005). Związki aromatyczne im są bardziej rozpuszczalne w roztworze glebowym i mniej hydrofobowe, tym łatwiej podlegają degradacji mikrobiologicznej.

Rozkład fenolu w glebie, w przeciwieństwie do innych związków jednopierścieniowych oraz wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA), nie jest przedmiotem intensywnych badań. Niewiele prac dotyczy biotycznych i abiotycznych czynników wpływających na jego rozkład. Może to wynikać z faktu, że związki o charakterze fenoli są głównymi składnikami jąder jednostek mikrokonstrukcyjnych substancji humusowych i z tego względu trudno jest śledzić ich losy w środowisku glebowym. Ponadto są wysoce reaktywne w stosunku do kompleksów organiczno-mineralnych gleby i szybko parują z roztworu glebowego (GALLET, KELLER, 1999).

Rozkład fenolu w glebie pochodzącej z plantacji trzciny cukrowej na Tajwanie przez szczep *Ralstonia taiwanensis* TJ86 badali CHEN i in. (2004). Wy-

kazali, że w glebie sterylnej, o pH 7,3, wilgotności 8,9% i zawartości materii organicznej 4,8%, całkowity rozkład tego związku w stężeniu 500  $\mu\text{g g}^{-1}$  s.m. gleby zachodził w ciągu 9 dni, natomiast dawka 1000  $\mu\text{g g}^{-1}$  s.m. gleby rozkładana była w tym czasie w 40%. Dla porównania, w glebie niesterylnej i bez inokulowanych bakterii fenol w niższej dawce w tym czasie ulegał mineralizacji w 30%, a w wyższym stężeniu nie był w niej degradowany. Z kolei SHIBATA i in. (2006) wykazali, że rozkład fenolu w stężeniu 30  $\text{mg kg}^{-1}$  gleby w siedmiu różnych glebach pochodzących z plantacji ryżu w Japonii zależał od ogólnej zawartości węgla organicznego oraz dostępności tlenu. W warunkach tlenowych czas rozkładu połowy wprowadzonej dawki fenolu wynosił od 1,7 dnia do 6,9 dnia, a w warunkach beztlenowych było to od 24 dni do 260 dni. Badania nad biodegradacją i adsorpcją fenolu w glebie prowadzili także BAKER i MAYFIELD (1980) oraz SCOTT i in. (1982, 1983).

Przeważająca większość zanieczyszczeń o charakterze aromatycznym wiąże się odwracalnie lub nieodwracalnie z frakcjami humusowymi. Największe powinowactwo wykazują one do frakcji humin, mniejsze do kwasów huminowych, a najmniejsze do kwasów fulwowych. SONG (2003) dowiódł, że 33,4% wprowadzonego do gleby toluenu wiązało się z humusem, z tego 27,9% z frakcją humin, 3% z frakcją kwasów huminowych i najmniej — 2,5% z kwasami fulwowymi. Podobne wyniki otrzymał on dla *o*-ksylenu. Bardziej hydrofobowy naftalen, wprowadzony do gleby piaszczystej o niewielkiej zawartości materii organicznej, w największym stopniu wiązał się z huminami (59%), w mniejszym z kwasami fulwowymi (28,2%), a w najmniejszym z kwasami huminowymi (12,8%) (KOHL, RICE, 1998). Z badań XINGA i in. (1997, 2001) wynika, że na właściwości sorpcyjne gleby mają wpływ jej rodzaj, wiek i sposób transformacji. Rozkład związków aromatycznych zachodzi lepiej w glebach o większej zawartości materii organicznej. LALLAI i MURA (2004) wykazali, że w glebie zawierającej 0,04% materii organicznej nie zachodziła biodegradacja pentachlorofenolu, natomiast w glebie o zawartości 7—8% rozkład był całkowity. DAVIS i MADSEN (1996) porównywali tempo rozkładu toluenu w czterech rodzajach gleb: piaszczystej, piaszczysto-ilastej, gliniastej pochodzącej ze środowiska zanieczyszczonego związkami aromatycznymi oraz gliniastej, wolnej od zanieczyszczeń. Najszybciej rozkład tego związku zachodził w glebie piaszczysto-ilastej o zawartości materii organicznej 4%. Czas rozkładu połowy wprowadzonej dawki toluenu 5  $\mu\text{g g}^{-1}$  gleby wynosił 57 godz., z kolei w glebie piaszczystej o zawartości materii organicznej 0,8% było to 165 godz.



Ważnym czynnikiem ograniczającym tempo biodegradacji związków aromatycznych jest zawartość wody w glebie. Zbyt niski poziom wilgoci ogranicza wzrost i przeżywalność bakterii, a nadmiar wody prowadzi do powstania warunków beztlenowych. Wpływ zawartości wody na rozkład toluenu w glebie badali DAVIS i MADSEN (1996). Niezależnie od dawki dodanego toluenu najszybciej jego rozkład przebiegał w glebie o 100% zawartości wody, wolniej przy wilgotności 14%, a proces ten nie zachodził, gdy zawartość wody wynosiła 2%. Wpływ różnej wilgotności gleby (od 20% do 70%) na wzrost, przeżywalność i rozkład naftalenu w glebie przez szczepy *Pseudomonas putida* G7 i *Pseudomonas putida* BS3701 badali także FILONOV i in. (1999).

Biodegradacja związków aromatycznych w glebach zachodzi szybciej, gdy występują w niej łatwo przyswajalne związki pokarmowe. Substancje organiczne stanowią nie tylko źródło węgla i energii, lecz także innych makroskładników pokarmowych, głównie fosforu, azotu i siarki. W wydajnej biodegradacji ważny jest stosunek ilości węgla do azotu i fosforu występujących w glebie. Według LIEBEGA i CUTRIGHTA (1999) powinien on wynosić 100:10:1, a zdaniem DAVISA i MADSENA (1996) — 100:9:2. Zarówno zbyt duża, jak i zbyt mała zawartość substancji organicznej wpływa hamująco na proces biodegradacji (HALUŠKA i in., 1995). Z badań CHAÎNEAU i in. (2003) wynika, że użycie mineralnych nawozów azotowych i uzyskanie stosunku C/N/P 100:10:1 w glebie znacznie zwiększyło stopień eliminacji z niej związków ropopochodnych. W glebie wzbogaconej w związki azotu 70—81% zanieczyszczeń uległo degradacji, gdy tymczasem w wyniku naturalnej atenuacji jedynie 56%. Podobny ubytek ropopochodnych skażeń obserwowali MARGESIN i SHINNER (2001) po użyczeniu gleby alpejskiej.

Ważnymi czynnikami w rozkładzie związków aromatycznych są także temperatura, pH i stężenie dostępnego tlenu; minimalna ilość powietrza wypełniającego przestrzeń w glebie powinna wynosić około 10%, optymalne pH 6—8, a temperatura 20—30°C (LEAHY, COLWELL, 1990; BOOPATHY, 2000). Niższa temperatura w naszej szerokości geograficznej przez większą część roku znacznie ogranicza efektywną biodegradację, ponieważ wpływa na właściwości węglowodorów (lepkość i rozpuszczalność w wodzie) oraz obniża aktywność degradacyjną mikroorganizmów (ERIKSSON i in., 2001).

Rozkład związków aromatycznych zależy także od wcześniejszej ekspozycji mikroorganizmów na działanie tych związków. Wykazano, że w glebach narażonych na ciągłe zanieczyszczenie węglowodorami aromatycznymi biodegradacja tych skażeń za-

chodziła szybciej niż w miejscach, które nie były uprzednio poddane ich wpływowi (DAVIS, MADSEN, 1996). Wynika to z adaptacji bakterii do toksycznych związków aromatycznych i zwiększenia ich udziału w zespołach mikroorganizmów zasiedlających skażone środowisko.

Niektóre substancje aromatyczne są szybciej rozkładane w glebie w obecności innych związków. Efekt ten, zwany kometabolizmem, polega na tym, że jeden ze związków wykorzystywany jest w procesie redukcji innego. W wyniku kometabolizmu następuje na przykład rozkład w glebie polichlorowanych bifenyli (PCB) przez szczepy *Ralstonia eutropha* i *Rhodococcus* sp. Kosubstratami, aktywnymi w komórkach tych bakterii gen *bhp* odpowiedzialny za degradację PCB, są dodatkowo wprowadzane do gleby monoterpeny i kwas salicylowy (LEUPROMCHAI i in., 2002).

Mikrobiologiczny rozkład trwałych i toksycznych związków o strukturze aromatycznej jest jednym z najefektywniejszych sposobów usuwania ich ze środowiska glebowego. Czynniki środowiskowe oraz bioróżnorodność populacji zasiedlających glebę utrudniają jednak śledzenie w niej losów i przemian tych związków oraz uniemożliwiają dokładne poznanie mechanizmów regulujących aktywność degradacyjną mikroorganizmów. Konieczne wydaje się więc poszukiwanie metod służących monitorowaniu stopnia eliminacji tych związków z gleby oraz zmian w składzie zespołów mikroorganizmów w warunkach stresu wywołanego obecnością substancji toksycznych.

## 1.9. Bioaugmentacja a rozkład związków aromatycznych w glebie

Zastosowanie do usuwania ze środowiska produktów ropopochodnych, jedno- i wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych oraz związków chlorowcopochodnych konwencjonalnych metod fizykochemicznych, takich jak: adsorpcja, ekstrakcja rozpuszczalnikami organicznymi, utlenienie, odparowanie czy rozpuszczenie, nie zawsze jest skuteczne i nie prowadzi do całkowitej ich eliminacji (LOH, WANG, 1998). Z wielu badań wynika, że obiecującą technologią prowadzącą do ich detoksykacji jest bioremediacja (ROMANTSCHUK, 2000; CHAÎNEAU i in., 2003; FISCHER i in., 2006; PRPICH i in., 2006). Polega ona na zastosowaniu mikroorganizmów lub wytwarzanych przez nie enzymów w procesie oczyszczania środowiska z zanieczyszczeń nie tylko przemysłowych, lecz także komunalnych. Bioremediację można podzielić na

dwie kategorie: *in situ* i *ex situ*. W bioremediacji *in situ* usuwanie zanieczyszczeń odbywa się w miejscu ich występowania, a w *ex situ* zachodzi w innym, specjalnie wyznaczonym do tego celu miejscu (BOOPATHY, 2000).

Bioaugmentacja jest jedną z technik bioremediacji, zarówno *in situ*, jak i *ex situ*, polegającą na wprowadzaniu do gleby wyselekcjonowanych mikroorganizmów zdolnych do rozkładu wybranych zanieczyszczeń (IWAMOTO, NASU, 2001; WATANABE, 2001; EL FANTROUSSI, AGATHOS, 2005). Idealne mikroorganizmy użyte w tym celu powinny się charakteryzować: szerokim zakresem aktywności degradacyjnej, odpowiednią szybkością działania, niezbyt długim czasem życia, mobilnością (zdolnością penetracji w głąb systemu), zdolnością do adhezji (z wyjątkiem punktu iniekcji w celu uniknięcia zatykania porów w glebie), elastycznością (odporne na fluktuacje pH, siły jonowej, stężenia jonów metali ciężkich) oraz niewielkim kosztem ich uzyskania (VOGEL, 1996). Pozyskiwanie takich szczepów obejmuje selekcję mikroorganizmów glebowych, izolację, otrzymanie czystych kultur oraz testowanie ich pod względem przydatności w biodegradacji konkretnego zanieczyszczenia.

Można wymienić kilka sposobów wprowadzania egzogenego szczepu lub konsorcjów bakterii do gleby. Po dokonaniu selekcji i ich namnożeniu bakterie można wprowadzać do miejsca, z którego naturalnie pochodziły, lub do miejsc, w których związek stanowiący skażenie ma podobne właściwości chemiczne do tego, jaki zanieczyszczał pierwotne źródło ich pochodzenia. Po raz pierwszy bioaugmentację zakończoną sukcesem przeprowadzono w Japonii w 2000 roku, z użyciem degradującego związku aromatyczne szczepu *Ralstonia eutropha* KT-2, w celu usunięcia z gleby trichloroetyleny (NAKAMURA i in., 2000). Reintrodukcja szczepów *Gordona* sp. BP9 i *Mycobacterium* sp. VF1 do gleb skażonych benzo[a]pirenem i szczepu *Pseudomonas fluorescens* NS1 do miejsc zanieczyszczonych ropą naftową także w znacznym stopniu przyspieszyła rozkład tych związków (KANALY, HARAYAMA, 2000; BARATHI, VASUDEVAN, 2003). Porównanie szybkości rozkładu oleju napędowego w glebie na drodze naturalnej atenuacji, biostymulacji i bioaugmentacji, z zastosowaniem 6-składnikowej mieszaniny bakterii z rodzajów *Bacillus*, *Acinetobacter* i *Pseudomonas*, wykazało, że wzbogacenie rodzimej mikroflory w nowe gatunki bakterii przynosi lepsze efekty niż inne metody bioremediacji (BENTO i in., 2005). Nie wszystkie mikroorganizmy wyselekcjonowane laboratoryjnie o określonym potencjale degradacyjnym nadają się jednak do bioaugmentacji. Jest to spowodowane słabą ich przeżywalnością, niską zdolnością do

konkurowania z autochtonicznymi mikroorganizmami lub zanikiem aktywności enzymatycznej po wprowadzeniu do gleby. W jaki sposób i jakimi metodami powinno się badać przydatność różnych bakterii do bioaugmentacji, na przykładzie szczepów *Pseudomonas mendocina* i *Pseudomonas fluorescens* wprowadzonych do gleb skażonych fenolem i związkami ropopochodnymi, prezentują HEINARU i in. (2005). Podkreślili oni także, że ważne jest, aby takie mikroorganizmy były bezpieczne dla człowieka, nie produkowały toksycznych metabolitów i nie oddziaływały antagonistycznie z naturalną mikroflorą gleby.

Na szczególną uwagę zasługuje wykorzystanie w bioaugmentacji mikroorganizmów zmodyfikowanych genetycznie (GMMs, ang. *genetically modified microorganisms*) (SAYLER, RIPP, 2000; ROMANTSCHUK i in., 2000; TOP i in., 2002; EL FANTROUSSI, AGATHOS, 2005). Tak skonstruowane laboratoryjnie mikroorganizmy po wprowadzeniu do gleby mogą być dawcami plazmidów degradacyjnych czy transpozonów dla potencjalnych biorców spośród mikroflory autochtonicznej. Ponieważ plazmidy są łatwo przenoszone, możliwe jest szybkie rozprzestrzenianie się zdolności degradacyjnych wśród mikroorganizmów na drodze horyzontalnego transferu genów (HGT, ang. *horizontal gene transfer*) (TOP, SPRINGAEL, 2003). Na przykład plazmid RP4:Tn4371 szczepu *Enterobacter agglomerans* DK3, odpowiadający za rozkład bifenylu, do którego został wbudowany transpozon Tn4371, z dużą częstotliwością przekazywany był do różnych gatunków rodzimych bakterii glebowych (DE RORE i in., 1994). Transfer i ekspresję plazmidu RP4:TOL, kodującego enzymy szlaków rozkładu benzenu, toluenu i ksylenu z *Escherichia coli* C600 do gatunków *Sinorhizobium meliloti*, *Bradyrhizobium japonicum* i *Bradyrhizobium elkanii*, obserwowali HOLLOWELL i in. (1999). Z kolei NEWBY i in. (2000) wykazali możliwość przenoszenia plazmidu pJP4, odpowiadającego za rozkład kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego z *E. coli* do bakterii glebowych, głównie z rodzaju *Pseudomonas* i *Burkholderia*. Przeżywalność uzyskanych transkonjugantów zależy od wielu czynników: rodzaju gleby, zawartości materii organicznej, konkurencji, obecności roślin, stężenia substancji zanieczyszczających oraz metali ciężkich (RAMOS-GONZALES i in., 1991; HILL, TOP, 1998; TOP i in., 2002). GMMs mogą wykazywać szeroką specyficzność substratową i mieć wysoki potencjał kataboliczny, ale zwykle giną szybko lub ich przeżywalność w skażonych środowiskach nie jest zadowalająca.

Badania nad bioaugmentacją dowiodły, że mikroorganizmy zmodyfikowane genetycznie mogą odnosić sukces w warunkach selekcyjnej presji spe-

cyficzego substratu. Nie są natomiast przydatne w środowisku zawierającym wiele substratów i różnorodnych mikroorganizmów bez specyficznej presji selekcyjnej. Zastosowanie GMMs do bioaugmentacji bez fizycznych ograniczeń i związane z nim względy biologicznego bezpieczeństwa budzą wiele wątpliwości. Ze względu na ograniczoną konkurencyjność wprowadzanie organizmów skonstruowanych w laboratorium metodami inżynierii genetycznej do otwartych systemów nie jest powszechnie akceptowane. Mikroorganizmy naturalnie występujące w środowisku mają potencjał do tworzenia nowych szlaków metabolicznych i są bardziej konkurencyjne, ponieważ przeszły selekcję naturalną (VAN DER MEER i in., 1992).

## 1.10. FAMES w badaniach środowiskowych

Procedura izolacji i identyfikacji komórkowych kwasów tłuszczowych (FAMES) została opracowana przez firmę MIDI Inc. (Newark, DE, USA) jako metoda służąca do oceny przynależności gatunkowej bakterii. Opiera się ona na założeniu, że skład komórkowych kwasów tłuszczowych, uwarunkowany genetycznie, jest charakterystyczną cechą każdego gatunku. Wiedząc jednak, że różne czynniki środowiskowe modyfikują profil kwasów tłuszczowych bakterii, możliwe jest także zastosowanie tej metody do analizy kwasów tłuszczowych, ekstrahowanych bezpośrednio z próbek gleby i wody. Wykorzystanie MIDI-FAME do identyfikacji bakterii wymaga ścisłego przestrzegania warunków hodowli (skład podłoża, temperatura, czas inkubacji) oraz stosowania odczynników chemicznych o wysokim stopniu czystości. Obecnie dzięki tej metodzie można identyfikować ponad 1500 gatunków bakterii. BRIM i in. (1999) użyli metody MIDI-FAME do identyfikacji dominujących szczepów, izolowanych z gleb zanieczyszczonych jonami cynku. Wykazali, że wśród metaloopornych szczepów najczęściej, bo 18 z 23, reprezentowało rodzaj *Arthrobacter*. TIGHE i in. (2000) użyli tej metody do ustalenia zależności filogenetycznych między ponad 600 szczepami należącymi do rodzajów: *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* i *Sinorhizobium*.

Analiza kwasów tłuszczowych izolowanych bezpośrednio z gleby umożliwia określenie podobieństw i różnic w zespołach mikroorganizmów. THOMPSON i in. (1995) na podstawie różnej zawartości FAMES izolowanych z dwóch identycznych, ale odseparowanych zespołów mikroorganizmów, do których wprowadzali genetycznie zmodyfikowa-

ny szczep *Pseudomonas fluorescens* lub szczep dziki, wykazali, że większy wpływ na ich skład wywierał szczep dziki. W innych badaniach CAVIGELLI i in. (1995) stwierdzili różnice między profilami FAMES ekstrahowanych bezpośrednio z gleby a wyizolowanych z niej mikroorganizmów, hodowanych laboratoryjnie na podłożach stałych. IBEKWE i KENNEDY (1999) na podstawie analizy FAMES ekstrahowanych z dwóch różnych gleb, na których uprawiano pszenicę, jęczmień i groch, wykazali zróżnicowany udział bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych w strefie ryzosferowej i pozaryzosferowej. Na podstawie obecności i wysokiej zawartości kwasów 15:0, 15:0 *iso*, 17:0 i 17:0 *anteiso* zaobserwowali, że w badanej glebie udział bakterii Gram-dodatnich był podobny zarówno w ryzosferze, jak i w glebie pozakorzeniowej. Gleby różniły się udziałem bakterii Gram-ujemnych, które wyodrębnili na podstawie charakterystycznych kwasów 10:0 3OH, 12:0 3OH i 17:0 *cy*. Więcej ich zasiedlało glebę przykorzeniową, a mniej — pozakorzeniową.

Użycie MIDI-FAME w badaniach środowiskowych umożliwia ponadto ocenę wpływu wielu czynników abiotycznych (temperatury, pH, związków toksycznych) na skład i bioróżnorodność zespołów mikroorganizmów. Wyraźną zależność między zmniejszającą się zawartością *cis*-nienasyconych kwasów tłuszczowych (16:1  $\omega$ 7*c* i 18:1  $\omega$ 7*c*) a wzrostem temperatury w glebie z 4°C do 25°C oraz z 5°C do 30°C obserwowali PETERSEN i KLUG (1994), a także PETERSEN i BÄÄTH (2003). HEIPIEPER i in. (1996) wykazali, że u szczepu *Pseudomonas putida* S12 w niskim pH wzrastał stosunek *trans/cis* nienasyconych kwasów tłuszczowych z 0,1 do 0,4. CHAO i HSU (2004) użyli metody FAME do oceny wpływu toluenu na skład mikroorganizmów glebowych. Dowiedli, że przed wprowadzeniem toluenu do gleby dominowały w niej bakterie Gram-dodatnie, głównie z rodzajów *Bacillus* i *Ceulomonas*, a po skażeniu gleby tym związkiem dominującymi stały się bakterie z rodzajów *Pseudomonas*, *Acinetobacter* i *Alcaligenes*, znane ze zdolności do rozkładu wielu różnych związków aromatycznych. KOZDRÓJ (2000) wykorzystał metodę MIDI-FAME do oceny składu zespołów mikroorganizmów hałdy popiołowej oraz żużlowej, metalurgicznej i nieżelazowej. W materiale z hałdy popiołowej wykazał obecność bakterii z grupy *Cytophaga-Flavobacterium*, charakterystycznej dla środowisk ubogich i silnie zdegradowanych, dla których markerowym kwasem tłuszczowym jest 16:1  $\omega$ 5*c*. Hałdę nieżelazową z kolei cechował duży udział kwasu 18:2  $\omega$ 6,9 świadczący o dominacji grzybów. W innych badaniach BUNDY i in. (2004) porównywali wpływ lekkiego oleju parafinowego

i ciężkiego oleju napędowego na populację mikroorganizmów w glebie. Po 2 miesiącach w glebie skażonej olejem parafinowym dominującymi kwasami były 15:0 i 17:1  $\omega$ 8, a w glebie zawierającej olej napędowy — 18:2  $\omega$ 6,9. Wyniki te potwierdzają fakt, że charakter zanieczyszczeń ma istotny wpływ na skład populacji mikroorganizmów glebowych.

Z wielu prac wynika, że analiza MIDI-FAME jest przydatną metodą w badaniach środowiskowych, chociaż występują w niej pewne ograniczenia. Stosując tę metodę, oprócz kwasów tłuszczowych pochodzących z mikroorganizmów, izoluje się z gleby kwasy związane z frakcjami próchnicowymi i korzeniami roślin (SCHUTTER, DICK, 2000). Porównanie metody MIDI-FAME z PLFA przez DRENOVSKY'EGO i in. (2004) wskazuje, że dzięki metodzie MIDI-FAME możliwe było izolowanie kwasów prostolącuchowych o długości łańcucha

do C14, natomiast wśród PLFAs kwasy te nie były identyfikowane. Ponadto w profilu kwasów tłuszczowych uzyskanym metodą MIDI-FAME stwierdzono wysoką zawartość kwasu markerowego dla grzybów, tzn. 18:2  $\omega$ 6,9, a mniejszym udziałem odznaczały się kwasy wskazujące na obecność promieniowców. Mimo wskazanych ograniczeń w stosowaniu tej metody, jest ona powszechnie używana w badaniach mikrobiologii środowiskowej i coraz częściej łączy się ją z metodami genetycznymi, na przykład SLB/ENAP, LH-PCR, PCR-DGGE i T-RFLP, stanowiącymi wspólnie bardziej zintegrowane narzędzie w określaniu zmian w składzie zespołów mikroorganizmów różnych środowisk, zarówno skażonych, jak i nieskażonych (VAN ELSAS i in., 1998; WHITE i in., 1998; MACNAUGHTON i in., 1999; RITCHIE i in., 2000; KOZDRÓJ, VAN ELSAS, 2001; TURPEINEN i in., 2004).

## Changes in bacterial fatty acid composition during phenol degradation in soil

### Summary

The aim of this study was to investigate the effects of phenol on fatty acid composition of *Pseudomonas vesicularis* and *Pseudomonas* sp. JS150 strains introduced into sterile L1, L2 and G soils and in *Pseudomonas*-inoculated non-sterile soils. Phenol was added to all soils at the concentration of 1.7 mg g<sup>-1</sup>, 3.3 mg g<sup>-1</sup> and 5.0 mg g<sup>-1</sup>. Simultaneously, the survival of both strains introduced into soils was estimated. The investigations were conducted in four separate experimental arrangements. The first comprised sterile soils with introduced *Pseudomonas vesicularis* strain, the second — sterile soils with *Pseudomonas* sp. JS150, the third—sterile soils containing the mixture of these strains and the fourth — *Pseudomonas*-inoculated non-sterile soils. FAMES extracted from these soils at the following sampling days were analysed by GC method and identified using software Sherlock, 3,90.

It was found that phenol degradation by *Pseudomonas vesicularis* or/and *Pseudomonas* sp. JS150 depended on type of soil, phenol contamination and inoculum composition. The highest phenol removal at each concentration in L1, L2 and G soils was observed when bacteria were used as a mixture, phenol was metabolized slower by *Pseudomonas* sp. JS150 and much slower by *Pseudomonas vesicularis*. It was also demonstrated that independently on inoculum composition phenol degradation rate varied depending on type of soil. In G soil with the highest amount of organic matter phenol degradation proceeded faster than in L1 soil with intermediate amount of organic matter and in L2 soil with the lowest amount of organic matter. Obtained results also indicated that increasing dose of phenol made its biodegradation much longer. On the basis of bacterial counts it was showed that *Pseudomonas* sp. JS150 strain better survived both in phenol-polluted and the unpolluted soils in comparison with *Pseudomonas vesicularis*. Bioaugmentation with *Pseudomonas vesicularis* and *Pseudomonas* sp. JS150 strain in all soils resulted in the increase of effectiveness of phenol removal as compared to control samples. It indicated that the interactions between autochthonous bacteria and strains introduced into soils were synergic.

The analyses of fatty acid percentages and composition in bacterial cells showed that they regulated of membrane fluidity and permeability in response to ac-

tual phenol concentration in soil. The first reaction of both strains in the presence of phenol added was *de novo* synthesis and changes in composition of saturated, straight-chain and branched fatty acids at the beginning days of experiment. While the phenol concentration decreased above 50% of dose used cyclopropane fatty acid 19:0 *cy* ω10*c* from these cells was isolated. In turn, the abundance of hydroxy fatty acids in that time decreased or they were not present in FAMES profiles. The ratio of saturated/unsaturated fatty acids appeared the useful marker for rate of phenol degradation by *Pseudomonas vesicularis* or/and *Pseudomonas* sp. JS150. At the first days of experiment when phenol concentration in soils was high saturated/unsaturated ratio increased. It highest value was calculated generally at day when the abundance of 19:0 *cy* ω10*c* fatty acid was the highest whereas at the following days simultaneously with phenol removal it decreased. The value of sat/unsat ratio varied in response to the type of soil, inoculum composition and dose of phenol added. The similar correlations between phenol concentration, the presence of 19:0 *cy* ω10*c* fatty acid and value of sat/unsat ratio were observed in phenol amended and *Pseudomonas*-inoculated soils and phenol amended but not-inoculated soils. The abundance of saturated, straight-chain and branched fatty acids changed also in these soils but the changes were significantly lower as compared to sterile soils with introduced of *Pseudomonas vesicularis* or/and *Pseudomonas* sp. JS150 strains. In turn, the amount of hydroxy fatty acids isolated from these soils remained at the similar level. It indicates that adaptive mechanisms to the presence of phenol were similar both in laboratory selective of *Pseudomonas vesicularis* and *Pseudomonas* sp. JS150 strains and in other species of bacteria naturally existing in soil.

It was confirmed that MIDI-FAME method could be used to monitor the progress of phenol elimination from soil. On the basis of fatty acid profiles and analysis of value of sat/unsat ratio it is possible to estimate if degradation of phenol by microorganisms in soil proceeds and the presence and abundance of 19:0 *cy* ω10*c* fatty acid indicate the progress of this process. For this reason, they may be good biomarkers of phenol contaminated environments.

## Die Veränderungen in der Zusammensetzung der bakteriellen Fettsäuren während des Phenolzerfalls im Boden

### Zusammenfassung

Zum Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Einwirkung des Phenols auf die Zusammensetzung der Fettsäuren bei den Stämmen *Pseudomonas vesicularis* und *Pseudomonas* sp. JS150 in sterilen Boden L1, L2 und G, und in nicht sterilen, mit Hilfe der genannten Stämme bioaugmentierten Boden. Alle Boden wurden mit dem Phenol in der Konzentration von 1,7 mg g<sup>-1</sup>, 3,3 mg g<sup>-1</sup> und 5,0 mg g<sup>-1</sup> verpestet. Gleichzeitig untersuchte man die Lebensfähigkeit der beiden Bakterienstämme nach deren Introdution in den Boden. Die Untersuchungen wurden in vier Versuchssystemen durchgeführt. Das erste System bildeten sterile Boden, zu denen der Stamm *Pseudomonas vesicularis* gegeben wurde, das zweite – sterile Boden mit *Pseudomonas* sp. JS150, das dritte – sterile Boden mit einer Mischung von den zwei genannten Stämmen, und das vierte System – nicht sterile, mittels der beiden Stämme bioaugmentierte Boden. Die aus den Boden in den einzelnen Versuchstagen gewonnenen FAMES wurden mittels der GC Methode getrennt und mittels der Sherlock-Software (Version 3,90) identifiziert.

Der durch die in sterile Boden L1, L2 und G eingeführten Bakterienstämme *Pseudomonas vesicularis* und/oder *Pseudomonas* sp. JS150 verursachte Phenolzerfall hing von der Bodenart, deren Verpestungsgrad und der Zusammensetzung des Inokulums ab. Am schnellsten wurden alle Phenolkonzentrationen in L1, L2 und G-Boden von dem Bakteriengemisch zerfallen. Der Stamm *Pseudomonas* sp. JS150 verursachte den langsameren und der Stamm *Pseudomonas vesicularis* den langsamsten Phenolzerfall. Außerdem stellte man Folgendes fest: unabhängig von der Inokulumzusammensetzung kam es zum schnellsten mikrobiologischen Phenolzerfall im G-Boden mit dem höchsten Gehalt der organischen Materie, zum langsameren Phenolzerfall im L1-Boden mit mittlerem Gehalt der organischen Materie und zum langsamsten Zerfall in dem an organischer Materie armen L2-Boden. Je höher die in die Boden eingeführte Phenolgabe war, desto länger dauerte es, bis die sich in den Boden befindenden Bakterienstämme zur völliger Degradation des Phenols geführt haben. Aufgrund der Bakterienzählung wurde festgestellt, dass eine bessere Lebensfähigkeit nicht nur in den mit Phenol verpesteten Boden, sondern auch in den Kontrollböden bei dem Stamm *Pseudomonas* sp. JS150 aufgewiesen

wurde. Der Bioaugmentationseffekt der Boden mit dem Gemisch von den beiden Bakterienstämmen konnte befriedigend beurteilt werden, denn die Effizienz des daraus eliminierten Phenols im Vergleich zu Kontrollböden wesentlich größer war. Die Ursache dafür kann synergistische Wechselwirkung zwischen den autochthonen Bakterien und den neu eingeführten Bakterienstämmen sein.

Aus den Analysen der Zusammensetzung und des Gehaltes von Fettsäuren in den Zellen der untersuchten Bakterienstämme während der Phenolzersetzung im Boden geht Folgendes hervor: je nach der aktuellen Phenolkonzentration im Boden werden von den Fettsäuren verschiedene Mechanismen in Gang gebracht, welche die Flüssigkeit und die Durchlässigkeit der Zellhaut zu regulieren haben. Die beiden Bakterienstämme reagierten auf den Phenol mit der *de novo* Synthese und der Veränderung in der Zusammensetzung von unverzweigten und verzweigten gesättigten Fettsäuren. Wenn sich die Konzentration des eingeführten Phenols um über eine Hälfte verringert hatte, wurde aus den Bakterienzellen die Zyklopropansäure 19:0 cy ω10c abgesondert. Der Gehalt von Hydroxylsäuren in den Zellen der beiden Bakterienstämme war während des Phenolzerfalls niedriger oder die Säure war in den FAMES Profilen gar nicht vorhanden. Als ein guter Indikator für den Grad des von *Pseudomonas vesicularis* und/oder *Pseudomonas* sp. JS150 in den Boden ablaufenden Phenolzerfalls zeigte sich das Verhältnis von den gesättigten und ungesättigten Fettsäuren. In den ersten Tagen bei hoher Phenolkonzentration wurde dieses Verhältnis höher. Den höchsten Wert erreichte es meist am dem Tag, als der höchste Gehalt von der Säure 19:0 cy ω10c beobachtet wurde. In den nächsten Tagen mit niedrigeren Phenolkonzentrationen in den Boden wurde das Verhältnis immer niedriger. Das Verhältnis von den gesättigten und ungesättigten Fettsäuren hing von der Bodenart, der Zusammensetzung des Inokulums und der Gabe des zur Bodenverpestung verwendeten Phenols ab. Solche Wechselwirkungen zwischen der Phenolkonzentration, dem Vorkommen von der Säure 19:0 cy ω10c und dem Verhältnis von den gesättigten und ungesättigten Fettsäuren wurden auch sowohl in den bioaugmentierten, wie auch in den nicht augmentierten phenolverpesteten Boden festgestellt. In den Boden wurde der Anteil von

unverzweigten und verzweigten Fettsäuren weniger verändert als in sterilen Boden mit den Stämmen von *Pseudomonas vesicularis* und/oder *Pseudomonas* sp. JS150, der Anteil von Oxykarbonsäuren dagegen war in den beiden Boden ähnlich. Das kann auf ähnliche Mechanismen der Anpassung ans Phenolverhandensein nicht nur bei laborausgewählten Stämmen *Pseudomonas vesicularis* und *Pseudomonas* sp. JS150, sondern auch bei anderen, in den untersuchten Boden natürlicherweise angesiedelten Mikroorganismen hindeuten.

Es wurde festgestellt, dass man die MIDI-FAME-Methode zum Überwachen der Phenolausscheidungsprogression aus dem Boden anwenden kann. Die Analyse von den Fettsäureprofilen und von dem Verhältnis von den gesättigten und ungesättigten Fettsäuren kann zur Bestätigung des Phenolverfalls im Boden verwendet werden; das Vorhandensein und der Prozentgehalt von der 19:0  $\omega$ 10c Säure kann auf den Entwicklungsgrad des Prozesses hindeuten. So können die Fettsäure als Biomarkers der Bodenverunreinigung mit Phenol betrachtet werden.

Redaktorzy Barbara Todos-Burny, Grażyna Wojdała

Projektant okładki Małgorzata Pleśniar

Redaktor techniczny Barbara Arenhövel

Korektor Lidia Szumigala

Copyright © 2009

by Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego

Wszelkie prawa zastrzeżone

**ISSN 0208-6336**

**ISBN 978-83-226-1874-5**

Wydawca

**Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego**

**ul. Bankowa 12B, 40-007 Katowice**

[www.wydawnictwo.us.edu.pl](http://www.wydawnictwo.us.edu.pl)

e-mail: [wydawus@us.edu.pl](mailto:wydawus@us.edu.pl)

---

Wydanie I. Ark. druk. 13,5. Ark. wyd. 15,0.

Przekazano do łamania w kwietniu 2009 r.

Podpisano do druku w czerwcu 2009 r.

Papier offset. kl. III, 80 g

Cena 25 zł

---

Łamanie: Pracownia Składu Komputerowego

Wydawnictwa Uniwersytetu Śląskiego

Druk i oprawa: EXPOL, P. Rybiński, J. Dąbek, Spółka Jawna

ul. Brzeska 4, 87-800 Włocławek

