

BAKTERIÁLNÍ DEGRADACE PCB

SONJA TOTEVOVÁ^a, MAREK PROUZA^a,
VLADIMÍR BRENNER^b
a KATEŘINA DEMNEROVÁ^a

^aÚstav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 3, 166 28 Praha 6, Mikrobiologický ústav, Akademie věd České republiky, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4

Došlo dne 12.VI.1997

Obsah

1. Úvod
2. Současný stav řešené problematiky
 - 2.1. Bakteriální degradace PCB
 - 2.1.1. Metabolismus degradace PCB
 - 2.1.2. Metabolismus degradace 2-hydroxy-2,4-pentadionové kyseliny
 - 2.1.3. Metabolismus degradace chlorbenzoátů
3. Závěr

1. Úvod

Polychlorované bifenyly (PCB) jsou látky, které mají na bifenylovém jádře 1-10 atomů chloru. Podle stupně chlorace jsou bezbarvé až žluté, méněchlorované PCB jsou kapaliny, vícechlorované jsou pevné látky. Vyráběly se chlorací bifenyly za zvýšené teploty, katalyzátorem reakce byly sole železa. Reakční směs byla pak neutralizována, destilována a získaný produkt rafinován. Tak vznikla směs chemických individuí, lišících se stupněm chlorace a polohou substituentů. Stupeň chlorace je možné ovlivnit množstvím chloru vstupujícím do reakce. Z 209 možných izomerů (kongenerů) jich vznikalo ve větším množství jen 102, a ty pak tvořily komerční směsi (obvykle obsahovaly 50-60 kongenerů).

PCB se začaly vyrábět ve 30. letech tohoto století a ukončení výroby po celém světě probíhalo od konce 70.

do druhé poloviny 80. let. Distribuovaly se pod různými obchodními názvy v mnoha zemích světa, např.: AROCLOR (Monsanto, USA a VB), KANECLOR (Kanegafuchi, Japonsko), CLOPHEN (Bayer, SRN), DELOR (Chemko Strážské, ČSSR). PCB mají nízkou tenzi par, vysokou dielektrickou konstantu, nízkou rozpustnost ve vodě, ohnivzdornost, inertnost, velký elektrický odpor a značnou hustotu. Jsou snadno rozpustné v organických rozpouštědlech, olejích a tucích. PCB jsou látky silně hydrofobní, rozpustnost ve vodě kolísá od 50 µg do 200 µg na litr při 20°C. Se vzrůstajícím stupněm chlorace (z 20 % na 80%) se všechny tyto vlastnosti zvyrazňují. Molární hmotnost a bod tání PCB se pohybuje v rozsahu 189,0 g.mol⁻¹ a 34 °C pro monochlorbifenyly až po 498,7 g.mol⁻¹ a 300 °C pro dekachlorbifenyly¹. PCB jsou velmi odolné vůči účinkům kyselin a zásad, redukci, nepodléhají oxidaci běžnými oxidačními činidly, jsou téměř rezistentní vůči hydrolýze a alkoholýze. Díky těmto vlastnostem se uplatnily v mnoha oblastech průmyslu. Byly využívány jako transformátorové oleje, hydraulické kapaliny, izolátory, protipožární stabilizátory nátěrových hmot apod.

Vzhledem k těmto vlastnostem je degradace PCB fyzikálně-chemickými metodami značně náročná, a hlavně drahá. Jednou z možných metod je spalování PCB ve vysokých martinských pecích za vysokých teplot (nad 1300 °C). V podmínkách, které jsou v současné době v České republice, je tento postup prakticky nerealizovatelný. Hlavním důvodem je nutnost udržení konstantní teploty, aby spalováním nedošlo ke vzniku ještě toxičtějších látek - dioxinů, tento požadavek s sebou nese značnou finanční náročnost celé technologie.

PCB patří mezi organické polutanty, jsou to xenobiotika, tj. látky, které do přírody vnesl svou činností člověk a které se v ní předtím nikdy nevyskytovaly. Za dobu manipulace s PCB pronikly tisíce tun těchto látek do životního prostředí. Toxicita PCB ještě není přesně objasněna, soudí se však, že velmi úzce souvisí se stupněm chlorace (čím vyšší počet substituentů, tím je toxicita PCB vyšší), a také s umístěním chlorů na bifenyly (toxické jsou zejména kongenery substituované v poloze *meta* a *para*). PCB se dostávají do těla člověka a různých živočichů potravním

řetězcem a mohou zde ve vyšších koncentracích způsobovat změny kůže, zvětšení jater, sleziny, štítné žlázy, a dokonce se předpokládá, že vyvolávají vznik nádorů.

Odstranění PCB ze životního prostředí je proto dnes velmi aktuální. Využití mikroorganismů, vhodnými adepty bioremediace jsou některé druhy půdních bakterií, ligninolytických hub a některých druhů rostlin, se jeví jako ekologicky šetrné a z hlediska finančních nákladů výhodné řešení.

Předkládaný souhrnný článek shrnuje dostupné informace o biodegradacích drahách PCB gramnegativních bakterií a jejich variabilitě v závislosti na charakteru chlorovaných substrátů.

2. Současný stav řešené problematiky

2.1 Bakteriální degradace PCB

Původně byly PCB považovány za látky rezistentní vůči mikrobiální transformaci, avšak v dnešní době byly již popsány bakteriální kmeny schopné metabolizovat specifické kongenery. Monochlorbifenyle někdy slouží jako zdroj uhlíku a energie, kongenery obsahující dva a více atomů chloru jsou transformovány kometabolismem s akumulací chlorovaných intermediátů, zejména chlorbenzoátů (působí inhibičně). Kometabolismus nepřináší bakterii žádnou energii, musí být podporován přítomností bifenyly, který slouží jako růstový substrát, a zároveň jako induktor potřebných enzymů.

Mechanismus bakteriální degradace PCB se zásadně liší podle podmínek - anaerobních nebo aerobních. Anaerobní bakterie reduktivně dechlorují vícesubstituované kongenery v polohách *meta* a *para*, a tím dochází ke snižování toxicity a ke kumulaci *ortho*-chlorovaných mono-, di- a trichlorbifenylů². Aerobní bakterie přímo atakují bifenylovou kostru méněchlorovaných kongenerů za vzniku chlorbenzoových a 5-C chloralifatických kyselin.

- U aerobních bakterií tvoří metabolismus PCB tři dráhy:
- bakterie metabolizující bifenyly a kometabolizující PCB na chlorbenzoáty a 5-C chloralifatické kyseliny
 - bakterie metabolizující chlorbenzoáty
 - bakterie dehalogenizující 5-C chloralifatické kyseliny.

Jedná se o tři typy bakterií, cílem je pomocí molekulárně-genetických metod sestrojít kmen s aerobním metabolismem, který by obsahoval kompletní genetickou výbavu pro mineralizaci PCB, kterou by navazoval na produkty metabolismu již zmíněných, účinných, anaerobních kmenů³.

V sedmdesátých letech se objevily první práce o aerobních bakteriích rostoucích na monochlorbifenylech jako jediném zdroji uhlíku. Jako první popsali Ahmed a Focht degradaci 4-chlorbifenyly a 4,4'-dichlorbifenyly dvěma kmeny bakterie *Achromobacter*⁴. Furukawa a spol. popsali v roce 1978 dva bakteriální kmeny *Alcaligenes* Y42 a *Acinetobacter* P6, schopné využívat bifenyly a 4-chlorbifenyly jako zdroj uhlíku a kometabolizovat některé kongenery PCB⁵.

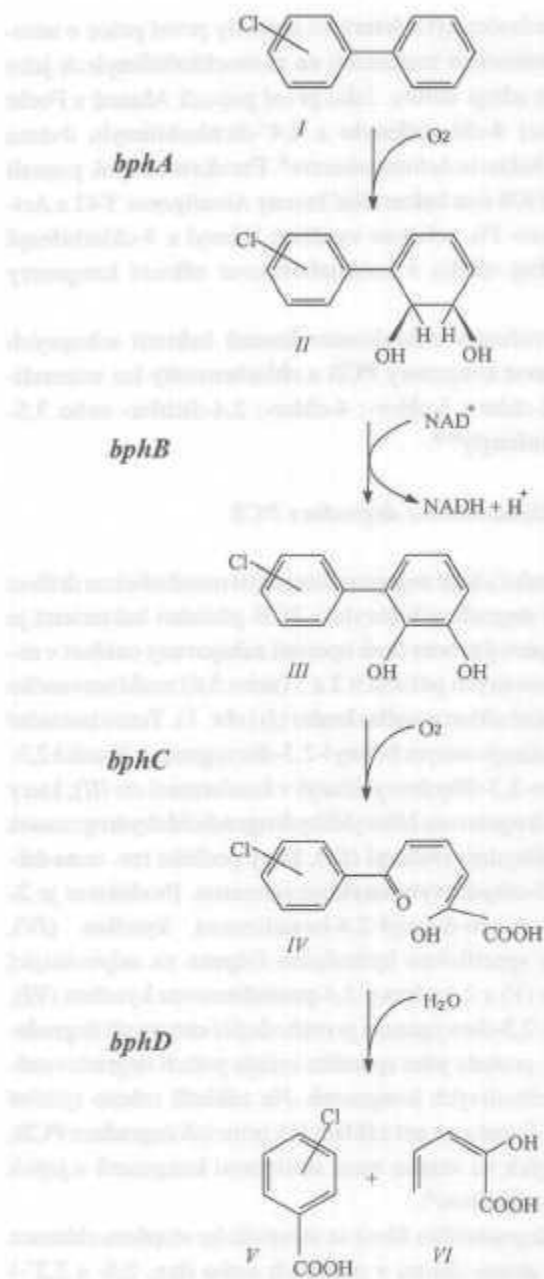
Vytvořením mikrokosmu kmenů bakterií schopných degradovat kongenery PCB a chlorbenzoáty lze mineralizovat 2-chlor-; 3-chlor-; 4-chlor-; 2,4-dichlor- nebo 3,5-dichlorbifenyle^{6,8}.

2.2.7. Metabolismus degradace PCB

Zásadní a také nejprostudovanější metabolickou dráhou aerobní degradace bifenyly a PCB půdními bakteriemi je čtyřstupňový proces (*bph* operon) zahajovaný oxidací v nesubstituovaných polohách 2 a 3 (nebo 5,6) nechlorovaného nebo méně chlorovaného kruhu (*I*) (obr. 1). Tento iniciační krok realizuje enzym bifenyly-2,3-dioxygenasa. Vzniká 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybifenylyl v konformaci *cis* (*II*), který je dehydrogenován bifenylydihydrogendioldehydrogenasou na 2,3-dihydroxybifenylyl (*III*), který podléhá tzv. *meta*-štěpení 2,3-dihydroxybifenylyldioxygenasou. Produktem je 2-hydroxy-6-oxo-6-fenyl-2,4-hexadienová kyselina (*IV*), která je specifickou hydrolasou štěpena na odpovídající benzoát (*V*) a 2-hydroxy-2,4-pentadienovou kyselinu (*VI*). Bifenyly-2,3-dioxygenasa je rozhodující enzym při degradaci PCB, protože jeho specifita určuje pořadí degradovatelnosti jednotlivých kongenerů. Na základě tohoto zjištění vyvodil Furukawa pět základních principů degradace PCB, založených na vztahu mezi strukturou kongenerů a jejich biodegradabilitou⁹:

- biodegradabilita klesá se stoupajícím stupněm chlorace
- dva atomy chloru v polohách *ortho* (tzn. 2,6- a 2,2'-) zvyšují rezistenci k biotransformaci
- kongenery s nesubstituovaným kruhem jsou obecně transformovány rychleji než kongenery se substitucí na obou kruzích
- tetra- a pentachlorbifenyle jsou transformovány mnohem snadněji, když jeden z kruhů je substituován v polohách 2 a 3
- iniciační oxidace obvykle probíhá na méně substituovaném kruhu.

Touto cestou dochází k transformaci méně substituovaných kongenerů. Existují však bakteriální kmeny schopné



Obr. 1. Metabolická dráha odbourávání bifenyly

degradovat široké spektrum PCB: *Acinetobacter* sp. P6, *Corynebacterium* sp. MB1, *Alcaligenes eutrophus* H850 a *Pseudomonas* sp. LB400. Kmen *Acinetobacter* sp. P6 při růstu na bifenyly nebo 4-chlorbifenyly může oxidovat široké spektrum PCB kongenerů (tetrachlorbifenyly, některé pentachlorbifenyly a hexachlorbifenyly). *Corynebacterium* sp. MB1 byl vyizolován jako kontaminant z kultury *Acinetobacter* sp. P6. Oba kmeny mají velmi podobné PCB

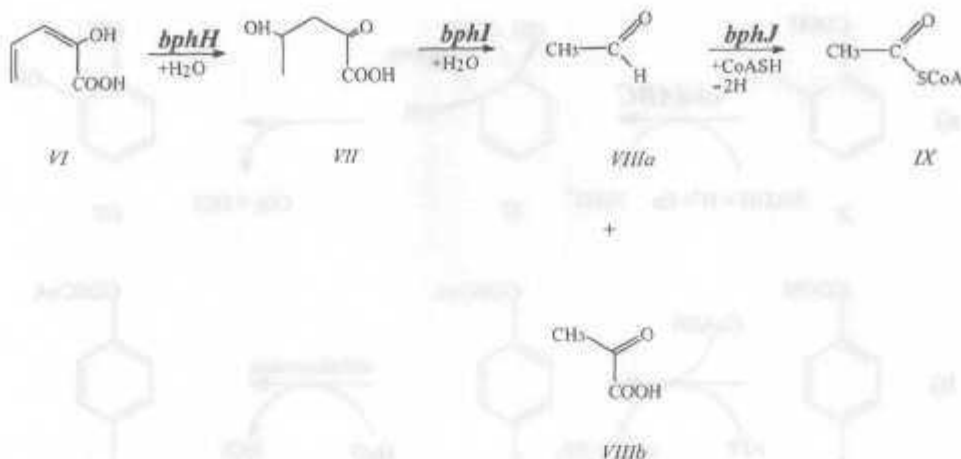
- degradační schopnosti. PCB kongenery jsou oxidovány dioxygenasovým atakem poloh 2 a 3 s následným *meta*-štěpením. Mohou být oxidována i některá disubstituovaná jádra, významná jsou ta se substitucí v polohách 2,3 a 3,4, ale žádný z těchto kmenů není schopen oxidovat jádra trisubstituovaná.

Bakteriální kmeny *Alcaligenes eutrophus* H850 (cit. ¹⁰) a *Pseudomonas* sp. LB400 (cit. ¹¹) byly vyizolovány v různých obdobích a z různých lokalit, přesto mají nápadně podobné kongenerové specifity. Oba kmeny vykazují velkou schopnost degradovat kongenery se substitucí v polohách 2; 2,4; 2,5; 2,3,6 a 2,4,5. Díky tomu degradují mnoho tetra- a pentachlorbifenyly a některé hexachlorbifenyly. Kromě toho však mohou oxidovat i 2,5,2',5'-tetrachlorbifenyly, tedy kongener, který má substituované 2,3 polohy, což vedlo k závěru, že kromě 2,3-dioxygenasy¹² mají tyto dva kmeny ještě 3,4-dioxygenasu. Kongenerová selektivita 3,4-dioxygenasy je odlišná od 2,3-dioxygenasy, a proto pro tuto cestu platí odlišné obecné principy založené na vztahu mezi strukturou kongeneru a jeho biodegradabilitou¹³:

- tetra- a pentachlorbifenyly substituované v polohách 2,5 jsou degradovány více než méně chlorované kongenery substituované v obou *para* polohách (polohy 4,4')
- mnoho *diortho*-substituovaných kongenerů (2,2'-dichlor-; 2,3,6- a 2,5,2'-trichlor- a 2,5,2',5'-tetrachlorbifenyly) a několik tri- a *tetraortho*-substituovaných kongenerů (2,4,6,2',5'-pentachlor-; 2,3,5,6,2',5'- a 2,3,6,2',3',6'-hexachlorbifenyly) je degradováno rychleji
- vícechlorované bifenyly substituované v polohách 2 a 3 jsou méně přístupné k degradaci než ty, které jsou substituované v polohách 2,5
- kongenery s nesubstituovaným kruhem jsou obecně transformovány rychleji než kongenery se substitucí na obou kruzích
- 2,4,4'- a 2,5,4'-trichlorbifenyly jsou degradovány cestou ataku a štěpení disubstituovaného kruhu za vzniku stejného produktu: 4-chlorbenzoátu.

Poloha substituentu na metabolizovaném kruhu zvyšuje účinnost biodegradace v pořadí: substituovaný *ortho*- > *meta*- > *para*-.

Při studiu metabolitů v jednotlivých krocích biodegradace kongenerů bylo ale zjištěno¹⁴, že rekombinantní kmeny *E. coli* DH1, DH5 α a BL21 (nesoucí geny bifenylového operonu *bphABC* nebo *bphABCD* na plasmidu pAIA50 resp. pAIA74), jejichž degradační schopnost byla srovnatelná s LB400, poskytovaly jako produkt degradace v případě 2,4,4'-trichlorbifenyly vlivem oxidace dichlorovaného kruhu pouze *ortho*-substituovaný 2-hydroxy-6-



Obr. 2. Metabolická dráha odbourávání 2-hydroxy-2,4-pentadienové kyseliny

-oxo-6-fenyl-2,4-hexadienoát a v případě 2,5,4'-trichlorbifenyly vlivem oxidace monochlorovaného kruhu *para*-substituovaný 2-hydroxy-6-oxo-6-fenyl-2,4-hexadienoát. Žádná odpovídající chlorbenzoová kyselina nebyla detegována. Tuto odchylku degradace rekombinantním kmenem od výsledků degradace kmenem LB400 je možné vysvětlit účinnějšími hydrolasami pro 2-hydroxy-6-oxo-6-fenyl-2,4-hexadienoát přítomnými v LB400, které rekombinantní kmen postrádá.

V případě *Pseudomonas* sp. LB400 bylo zjištěno, že je schopná využívat 2,2'- a 2,4'-dichlorbifenyly jako zdroje uhlíku, tyto substráty degraduje přednostně pomocí bifenyl-2,3-dioxygenasy¹⁵. Mutace, která inaktivovala 2,3-dioxygenasovou aktivitu, eliminovala také 3,4-dioxygenasovou aktivitu. Proto zatím není jasné, zda pochází obě z jednoho enzymu, nebo zda jde o dva různé enzymy, které jsou spoluregulovány nebo sdílí společně podjednotky.

2.7.2. *Metabolismus degradace 2-hydroxy-2,4-pentadienové kyseliny*

Metabolismus odbourávání 2-hydroxy-2,4-pentadienové kyseliny má klíčový význam při stabilitě genů pro odbourávání polychlorovaných bifenyly pro eventuální klonování těchto genů do recipientních kmenů. 2-hydroxy-2,4-pentadienová kyselina (VI) je vlivem 2-hydroxy-2,4-pentadienoáthdratasy převedena na kyselinu 4-hydroxy-2-oxovalerovou (VII), která se rozpadá účinkem specifické aldolasy na acetaldehyd (VIIIa) a na kyselinu pyrohroznovou (VIIIb). Acetaldehyd (VIIIa) je přítomností enzymu acetaldehyddehydrogenasy převeden acylací na acetylkoenzymA (IX) (obr. 2)¹⁶.

2.1.3. *Metabolismus degradace chlorbenzoátu*

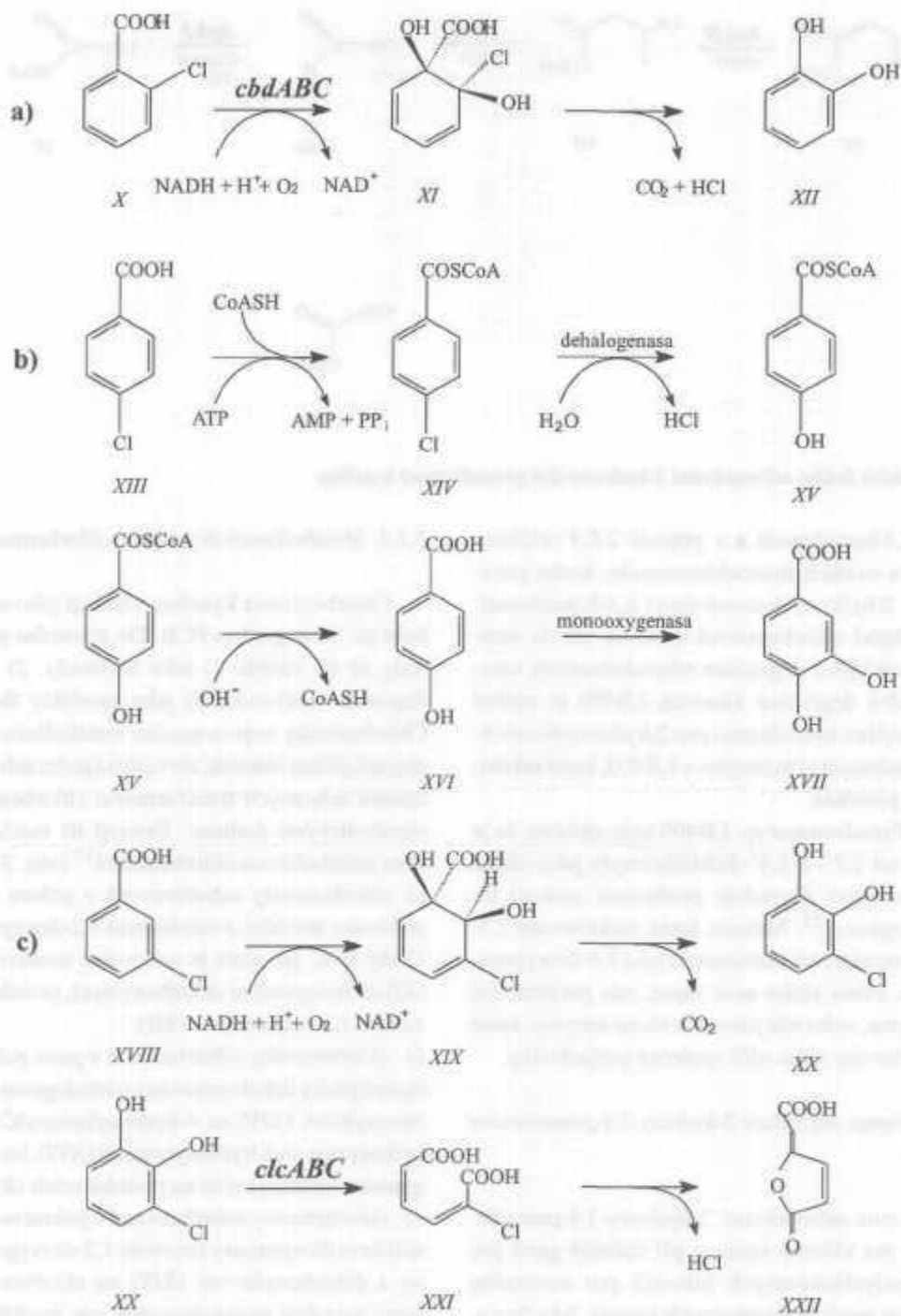
Chlorbenzoové kyseliny vznikají jako majoritní metabolit při biodegradaci PCB. Do životního prostředí se dostaly ze tří zdrojů: 1) jako herbicidy, 2) jako produkty degradace herbicidů, 3) jako produkty degradace PCB. Chlorbenzoáty nejsou snadno metabolizovány bakteriemi degradujícími benzoát, ale vzrůstá počet informací o izolaci kmenů schopných transformovat chlorbenzoáty různými metabolickými drahami. Existují tři mechanismy aerobního metabolismu chlorbenzoátů¹⁷ (obr. 3):

a) chlorbenzoáty substituované v poloze *ortho* (X) jsou atakovány iniciační *o*-chlorbenzoát-1,2-dioxygenasou (OCBD). Druhý krok, při němž je samovolně uvolňován CO₂ a HCl (XI) (dehalogenační dekarboxylace), probíhá spontánně za vzniku 1,2-benzendiolu (XII).

b) chlorbenzoáty substituované v *para* poloze (XIII) jsou hydrolyticky dehalogenovány (dehalogenasa) přes 4-chlorbenzoylCoA (XIV) na 4-hydroxybenzoylCoA (XV), který hydrolyzuje na 4-hydroxybenzoát (XVI), který je monooxygenasou hydroxylován na protokatechát (XVII).

c) chlorbenzoáty substituované v poloze *meta* (XVIII) jsou účinkem dioxygenasy (benzoát-1,2-dioxygenasa) oxidovány a dekarboxylovány (XIX) na chlorbenzendioly (XX), které jsou dále metabolizovány tzv. modifikovanou *ortho* dráhou na 2-chlor-*cis,cis*-mukonovu kyselinu (XXI) spontánně cyklizující na *cis*-5-karboxy-2,4-pentadien-4-olid (XXII). Byl však popsán metabolismus všech tří monochlorbenzoátů tímto mechanismem¹⁸, díky nižší substrátové specifitě enzymů metabolizujících benzoát.

Typickým představitelem bakteriálního kmene využívaného první typ metabolismu degradace chlorbenzoátů



Obr. 3. Metabolismus chlorbenzoátů; a) *ortho* dráha, b) *para* dráha, c) *meta* dráha

(*ortho* dráha) je bakterie *Pseudomonas cepacia* 2CBS, vybavená enzymovým systémem 2-halobenzoát-1,2-dioxygenasou¹⁹. Tento kmen je schopen využít 2-chlorobenzoát jako zdroj uhlíku a energie. Ačkoliv dioxygenasový systém tohoto kmene má širokou substrátovou speci-

fitu, preferuje degradaci benzoátů substituovaných v poloze *ortho*, zvláště pokud substituent není příliš objemný. *Ortho*-halobenzoát-1,2-dioxygenasa, enzym pocházející z kmene *Pseudomonas aeruginosa* 142, má velmi podobnou substrátovou specifitu jako 2-halobenzoát-1,2-dioxy-

genasa, přestože se tyto dva enzymy liší počtem podjednotek. *Ortho*-halobenzoát-1,2-dioxygenasa je třípodjednotkový enzym, kdežto 2-halobenzoát-1,2-dioxygenasa pouze dvoupodjednotkový (malá a velká podjednotka). Aminokyselinové sekvence 2-halobenzoát-1,2-dioxygenasy vykazují homologii se sekvencemi benzoát-1,2-dioxygenasy a toluát-1,2-dioxygenasy, a to v rozmezí 38-45 % (cit.²⁰).

Druhou metabolickou drahou je *para* dráha. Chlorbenzoáty substituované v *poloze para* (*XIII*) jsou hydrolyticky dehalogenovány za vzniku *p*-hydroxybenzoátů (*XVI*). V dalším kroku je *p*-hydroxybenzoát (*XVI*) monooxygenasou hydroxylován na protokatechát (*XVII*)²¹. Aromatický kruh tohoto metabolitu může být dále štěpen dioxygenasou, a to buď *ortho*-, nebo *meta*-štěpením. Tímto postupem se *para* dráha zcela liší od modifikované *ortho* dráhy, protože nejdříve dochází k dehalogenaci, a pak teprve ke štěpení aromatického kruhu. Zajímavé je, že chemicky by dehalogenace probíhala při extrémních podmínkách (koncentrovaný NaOH, 300 °C) a zde probíhá za podmínek fyziologických. Představitelem této dráhy je kmen *Pseudomonas* sp. CBS3 (cit.²²).

Nicméně bylo prokázáno, že se v půdních mikrokozmech vyskytuje vysoká koncentrace protoanemoninu - antibiotika s rostlinným původem, jehož toxicita má zcela zásadní vliv na přežívání mikroorganismů v půdě. Možný vznik protoanemoninu (*XXVII*)²³ je zobrazen na obr. 4. Hydrolytická dehalogenace 4-chlorbenzoátu (*XIII*) vede k 4-hydroxybenzoátu (*XVI*) viz obr. 3b. Hydroxylací katalyzovanou dioxygenasou vzniká po dehydrogenaci 4-chlorpyrokatechol (*XXIII*), který přechází *meta*-štěpením vlivem pyrokatechol-2,3-dioxygenasy na 5-chlor-2-hydroxymukonát semialdehyd (*XXIV*). *Ortho*-štěpením 4-chlorpyrokatecholu (*XXIII*) katalyzovaným pyrokatechol- a chlorpyrokatechol-1,2-dioxygenasou vzniká 3-chlor-*cis,cis*-mukonát (*XXV*), který vlivem specifické cykloisomerasy specializované bakterie přechází na *trans*-5-karboxy-2,4-pentadien-4-olid (*XXVI*)²⁴, účinkem bakteriální cykloisomerasy na protoanemonin (*XXVII*)²⁵ a 1,4-cykloizomerací specifickou cykloisomerasou *Trichosporan cutaneum*²⁶ na lakton 3-chlormukonátu (*XXVIII*). Modifikovaná *ortho* dráha je analogická dráze kódované na TOL plasmidu pro degradaci toluenu^{27,28}, benzoát-1,2-dioxygenasa vnese molekulu kyslíku na aromatický kruh chlorbenzoátu (může to být kterýkoliv ze tří monochlorbenzoátů) za vzniku chlorbenzendiolu. Teprve pak je aromatický kruh štěpen (*meta*-štěpení) na mukonové semialdehydy. Bifenyl degradující bakteriální kmen *Pseudomonas cepacia* P166, který

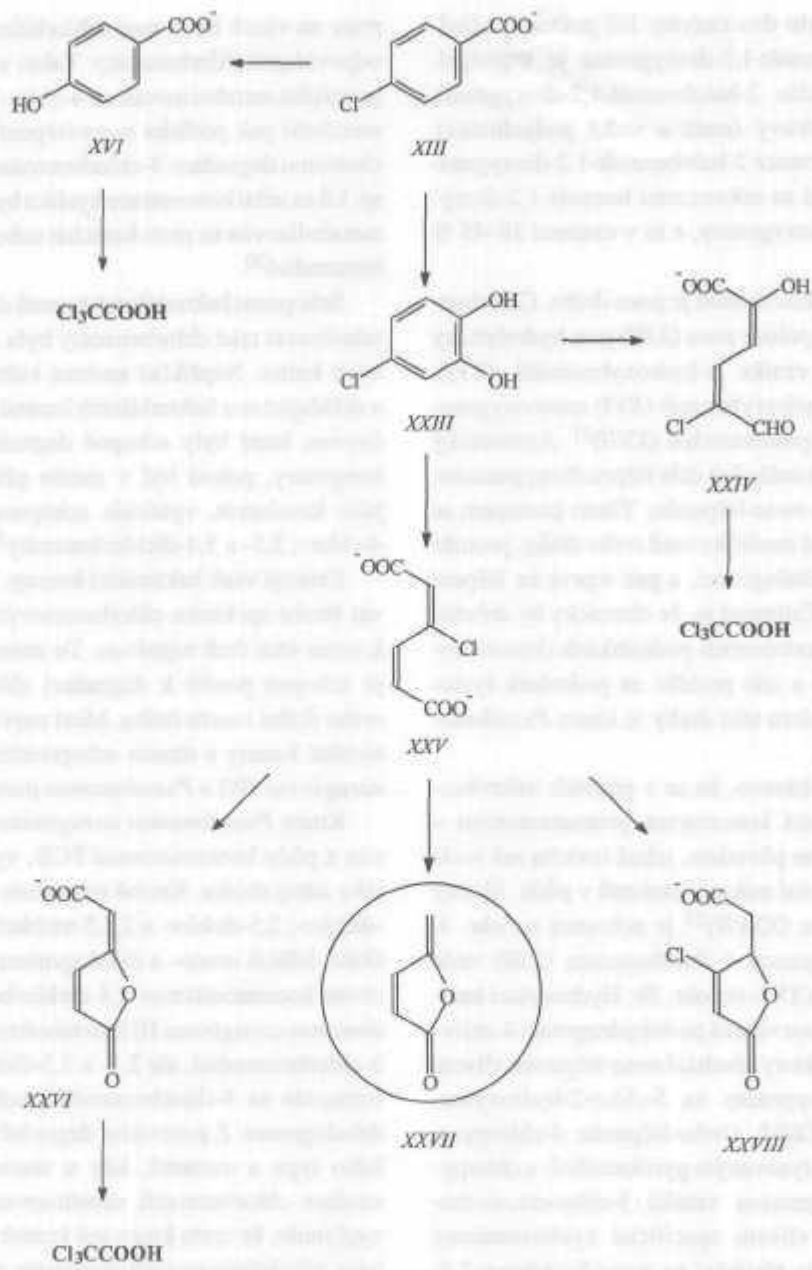
roste na všech třech monochlorbifenyloch, produkuje jim odpovídající chlorbenzoáty. Takto vzniklý 4-chlorbenzoát je vzápětí metabolizován na 4-chlor-1,2-benzendiol. Tento metabolit pak podléhá *meta*-štěpení²⁹. Při porovnání mechanismu degradace 3-chlorbenzoátu kmenem *Alcaligenes* sp. L6 za nižší koncentrace kyslíku byl 3-chlorbenzoát spíše metabolizován na protokatechát nebo gentisát než na chlorbenzendiol³⁰.

Schopnost bakteriálních kmenů degradujících PCB metabolizovat také chlorbenzoáty byla objevena také u směsných kultur. Například směsná kultura označená MIXE1 a skládající se z bakteriálních kmenů *Pseudomonas* a *Alcaligenes*, které byly schopné degradovat nízkochlorované kongenery, pokud byl v médiu přítomen 4-chlorbifenyl jako kosubstrát, vykazovala schopnost degradovat 2-; 3-; 4-chlor-; 2,5- a 3,4-dichlorbenzoáty³¹.

Existují však bakteriální kmeny, které dokáží degradovat široké spektrum chlorbenzoových kyselin a využívají k tomu více drah najednou. To znamená, že takový kmen je schopen použit k degradaci chlorbenzoátů například *ortho* dráhu i *meta* dráhu. Mezi nejvíce prostudované bakteriální kmeny s těmito schopnostmi patří *Pseudomonas aeruginosa* JB2 a *Pseudomonas putida* P111.

Kmen *Pseudomonas aeruginosa* JB2, který byl izolován z půdy kontaminované PCB, využívá 2-chlorbenzoát jako zdroj uhlíku. Kromě toho roste také na 3-chlor-; 2,3-dichlor-; 2,5-dichlor- a 2,3,5-trichlorbenzoátech a na široké škále dalších mono- a dihalogenbenzoátů. Byl také pozorován kometabolismus 2,4-dichlorbenzoátu. Kmen *Pseudomonas aeruginosa* JB2 metabolizoval 2-chlorbenzoát na 3-chlorbenzendiol, ale 2,3- a 2,5-dichlorbenzoát byl transformován na 4-chlorbenzendiol, což naznačuje počáteční dehalogenaci. Z porovnání degradačních schopností divokého typu a mutantů, kdy u mutantů došlo ke snížení oxidace chlorbenzoátů substituovaných v poloze *ortho*, vyplynulo, že tento kmen má kromě benzoát-1,2-dioxygenasy, také halobenzoátdioxygenasu, nezbytnou k degradaci chlorbenzoátů substituovaných v poloze *ortho*³². Jeden kmen tedy obsahuje DNA nesoucí dráhy *ortho* i *meta*.

Pseudomonas putida P111 je kmen s nejširší škálou chlorbenzoátů, které dokáže využít jako růstové substráty. Kmen byl izolován růstem na 2,5-dichlorbenzoátu jako zdroji uhlíku, kromě toho je schopný růst také na 2-chlor-; 3-chlor-; 4-chlor-; 2,3-dichlor-; 2,4-dichlor- a 2,3,5-trichlorbenzoátu. Nicméně 3,5-dichlorbenzoát kompletně inhibuje růst P111 na všech *ortho*-substituovaných benzoátech, na kterých byla testována. Odpočívající buňky P111 rostoucí na 4-chlorbenzoátu uvolňují chloridové ionty z 3,5-dichlor-



Obr. 4. Degradace 4-chlorbenzoátu

benzoátu a produkují neznámý intermediát. Naopak odpovídající buňky rostoucí na 2,5-dichlorbenzoátu metabolizují 3,5-dichlorbenzoát bez uvolňování chloridů za vzniku substituovaného cyklohexadienu³³. To tedy opět ukázalo existenci dvou enzymových systémů, schopných metabolizovat chlorbenzoáty, a to benzoát-1,2-dioxygenasy, který katalyzuje metabolismus benzoátu, 3- a 4-chlorbenzoátu, a chlorbenzoát-1,2-dioxygenasy, který

metabolizuje *ortho*-chlorbenzoáty³⁴. Varianty P111A, P111B a P111D se od divokého kmene P111 liší jak genetickou výbavou, tak schopnostmi metabolizovat chlorbenzoáty.

Kromě gramnegativních bakterií schopných degradovat chlorbenzoáty (převážně rodu *Pseudomonas*) existují i grampozitivní bakterie s touto schopností. Patří mezi ně i *Rhodococcus oparus* GM-14, actinomyceta s širokým

spektrům halogenovaných aromatických sloučenin, které využívá jako jediný zdroj uhlíku. Kromě derivátů benzenu a fenolu mezi ně také patří deriváty benzoátu, zejména pak 3-chlorbenzoát³⁵.

3. Závěr

Využití biologických systémů pro odstraňování polychlorovaných bifenylnů (PCB) z přírodního prostředí patří ke slibným, ekonomicky výhodným a šetrným metodám. Přestože byla popsána řada kmenů, které jsou schopny odbourávat PCB, nebyla dosud navržena univerzálně použitelná biotechnologie, pomocí které by byly PCB ze životního prostředí účinně odstraňovány. Dalším směrem výzkumu v této oblasti je, na základě znalostí metabolických drah a genového vybavení, konstrukce nových kmenů s využitím molekulárně biologických metod a navržení technologií, které by umožnily jejich využití v uzavřeném systému.

LITERATURA

1. Pal D., Weber J. B., Overcash M. R.: *Residue Reviews* 74, 45 (1980).
2. Bedard D. L.: *Biotechnol. Biodegrad.* 4, 369 (1980).
3. Abramowicz D. A.: review. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* 10, 241 (1990).
4. Ahmed M., Focht D. D.: *Can. J. Microbiol.* 19, 47 (1973).
5. Furukawa K., Matsumura F., Tonomura K.: *Agric. Biol. Chem.* 42, 543 (1978).
6. Havel J., Reineke W.: *Appl. Microbiol. Biotech.* 38, 129 (1992).
7. Hickey W. I.: *PhD disertační práce*. Dept. of Soil Science, University of California, Riverside 1990.
8. Kilpi S., Himberg K., Yrjalä K., Backström V.: *FEMS Microbiol. Ecology* 53, 19 (1988).
9. Furukawa K.: *Biodegradation* 5, 289 (1994).
10. Bedard D. L., Wagner R. E., Brennan M. J., Haberl M. L., Brown J. F.: *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1094 (1987).
11. Erickson B. D., Mondello F. J.: *J. Bacteriol.* 174, 2903 (1992).
12. Haddock J. D., Nadim L. M., Gibson D. T.: *J. Bacteriol.* 775, 395 (1993).
13. Bedard D. L., Haberl M. L., May R. J., Brennan M. J.: *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1103 (1987).
14. Seeger M., Timmis K. N., Hofer B.: *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2654 (1995).
15. Seeger M., Timmis K. N., Hofer B.: *FEMS Microbiol. Letters* 133, 259 (1995).
16. Hofer B., Blasco R., Megharaj M., Seeger M., McKay D., Wittich R. M., Pieper D. H., Timmis K. N., vknize: *Mol. Biology of Pseudomonads* (Nakazawa T., a spol., ed.), str. 121. ASM Press, Washington, D.C. 1996.
17. Arensdorf J. J.: *PhD disertační práce*. Dept. of Soil Science, University of California, Riverside 1994.
18. Häggblom M. M.: *FEMS Microbiol. Rev.* 103, 29 (1992).
19. Fetzner S., Müller R., Lingens F.: *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 370, 1173 (1989).
20. Fetzner S., Lingens F.: *Microbiol. Rev.* 58, 641 (1994).
21. Adriaens P., Kohler H. P. E., Kohler-Staub D., Focht D. D.: *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 887 (1989).
22. Savard P., Peloquin L., Sylvestre M.: *J. Bacteriol.* 168, 81 (1986).
23. Blasco R., Mallavarapu M., Wittich R. M., Timmis K. N., Pieper D. H.: *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 427 (1997).
24. Schmidt E., Knackmuss H. J.: *Biochem. J.* 192, 339 (1980).
25. Blasco R., Wittich R. M., Mallavarapu M., Timmis K. N., Pieper D. H.: *J. Biol. Chem.* 270, 29229 (1995).
26. Mazur P., Pieken W. A., Budihars S. R., Williams S. E., Wong S., Kozarich J. W.: *Biochemistry* 33, 1961 (1994).
27. Reineke W., Jeenes D. J., Williams P. A., Knackmuss H. J.: *J. Bacteriol.* 750, 195 (1982).
28. Burlage R. S., Hooper S. W., Saylor G. S.: *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1323 (1989).
29. Arensdorf J. J., Focht D. D.: *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 443 (1995).
30. Krooneman J., Wieringa E. B. A., Moore E. R. B., Gerritse J., Prins R. A., Gottschal J. C.: *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2427 (1996).
31. Fava F., Di Gioia D., Marchetti L., Quattroni G., Marraffa V.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40, 541 (1993).
32. Hickey W. J., Focht D. D.: *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 3842 (1990).

33. Hernandez B. S., Higson F. K., Kondrat R., Focht D. D.: *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3361 (1991).
34. Brenner V., Hernandez B. S., Focht D. D.: *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2790 (1993).
35. Zaitsev G. M., Uotila J. S., Tsitko I. V., Lobanok A. G., Salkinoja-Salonen M. S.: *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 4191 (1995).

S. Totevová^a, M. Prouza^a, V. Brenner^b and K. Demnerová^a (^a*Department of Biochemistry and Micro biology, Institute of Chemical Technology,* ^b*Institute of Microbio-*

logy, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague):
Bacterial Biodegradation of PCBs

The review summarises current knowledge about the different metabolic pathways of PCBs which occur mainly in Gram-negative bacteria. The complete degradation of PCBs includes three metabolic pathways: „upper” pathway - degradation of PCB to chlorbenzoates and pentadiene acids, „lower“ pathway - degradation of chlorbenzoates, degradation of pentadiene acids. Examples of different metabolic routes in various bacterial strains are given.